

PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro

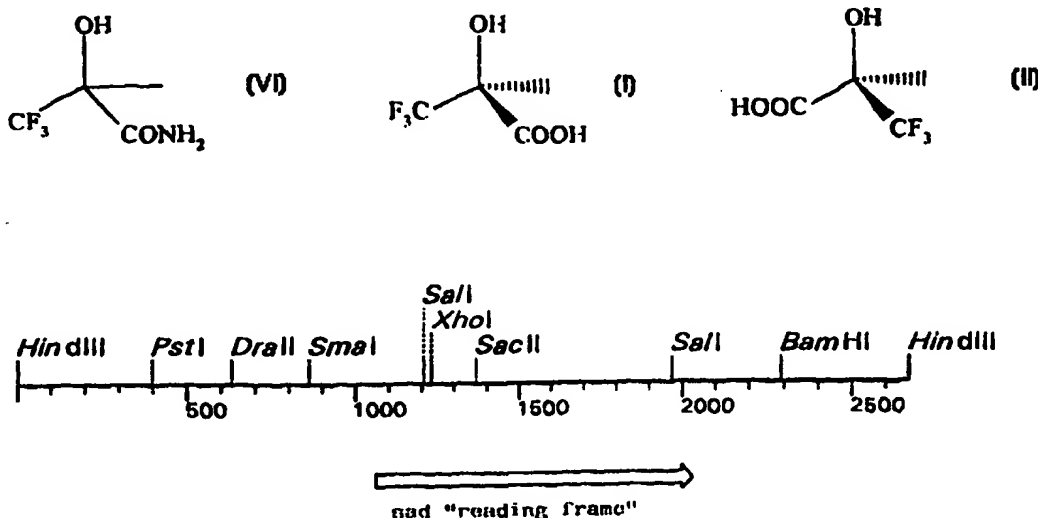


INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 6: C12N 15/55, 9/80, C12P 41/00, 7/42, C12N 1/21, 1/20, C07C 235/06, 231/06 // C12P 13/02, (C12N 1/20, C12R 1:06, 1:07, 1:22, 1:38, 1:41) (C12N 1/21, C12R 1:01)		A3	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 98/01568 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 15. Januar 1998 (15.01.98)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP97/03670 (22) Internationales Anmeldedatum: 10. Juli 1997 (10.07.97) (30) Prioritätsdaten: 1723/96 10. Juli 1996 (10.07.96) CH 500/97 3. März 1997 (03.03.97) CH (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): LONZA AG [CH/CH]; (Geschäftsleitung: 4002 Basel), CH-3945 Gampel (CH). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): BRIEDEN, Walter [DE/CH]; Grundbielstrasse 9, CH-3902 Glis (CH). NAUGHTON, Andrew [US/CH]; Weingartenweg 16, CH-3930 Visp (CH). ROBINS, Karen [AU/CH]; St. Martinistrasse 3, CH-3930 Visp (CH). SHAW, Nicholas [GB/CH]; Weingartenweg 14, CH-3930 Visp (CH). TINSCHERT, Andreas [DE/CH]; Kronengasse 4, CH-3900 Brig (CH). ZIMMERMANN, Thomas [DE/CH]; Furkastrasse 9, CH-3904 Naters (CH).		(74) Anwälte: RITTHALER, Wolfgang usw.; Alois-Steinecker- Strasse 22, D-85354 Freising (DE). (81) Bestimmungsstaaten: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, HU, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO Patent (GH, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG). Veröffentlicht Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen. (88) Veröffentlichungsdatum des internationalen Recherchen- berichts: 19. Februar 1998 (19.02.98)	

(54) Title: METHOD OF PREPARING (S) - OR (R) -3,3,3-TRIFLUORO-2-HYDROXY-2- METHYLPROPIONIC ACID

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG VON (S)- ODER (R)-3,3,3-TRIFLUOR-2-HYDROXY-2-
METHYLPROPIONSAURE



(57) Abstract

Described are new micro-organisms and a new enzyme capable of using as sole source of nitrogen the propionic acid amide of formula (VI), in racemate form or as optically active isomers. Described also is a method of preparing (S) - or (R)-3,3,3-trifluoro-2-hydroxy-2-methylpropionic acid of formulas (I) and (II) starting from trifluoroaceto-acetic ester. The first three process steps are chemical, the fourth process step microbiological.

(57) Zusammenfassung

Beschrieben werden neue Mikroorganismen und ein neues Enzym, die befähigt sind, das Propionsäureamid der Formel (VI) in Form des Racemats oder seiner optisch aktiven Isomere als einzige Stickstoffquelle zu verwerten. Des weiteren wird ein Verfahren zur Herstellung von (S)- oder (R)-3,3,3-Trifluor-2-hydroxy-2-methylpropionsäure der Formeln (I) und (II), ausgehend von Trifluoracetessigester, beschrieben. Die ersten drei Verfahrensstufen werden chemisch, die vierte Verfahrensstufe wird mikrobiologisch durchgeführt.

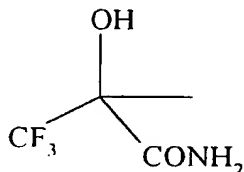
LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauritanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

Verfahren zur Herstellung von (S)- oder (R)-3,3,3-Trifluor-2-hydroxy-2-methylpropionsäure

Die vorliegende Erfindung betrifft ein neues Verfahren zur Herstellung von (S)- oder (R)-3,3,3-Trifluor-2-hydroxy-2-methylpropionsäure sowie neue Mikroorganismen, die befähigt sind das Propionsäureamid der Formel



VI

in Form des Racemats oder seiner optisch aktiven Isomere als einzige Stickstoffquelle zu verwerten.

(S)-3,3,3-Trifluor-2-hydroxy-2-methylpropionsäure ist ein wichtiges Zwischenprodukt zur Herstellung von therapeutischen Amiden (EP-A 0 524 781).

Im folgenden wird 3,3,3-Trifluor-2-hydroxy-2-methylpropionsäure mit 2,2-HTFMPS und 3,3,3-Trifluor-2-hydroxy-2-methylpropionsäureamid mit 2,2-HTFMPA abgekürzt.

Gemäss J. Chem. Soc., 1951, S. 2329 wird ein Verfahren zur Herstellung von (S)-2,2-HTFMPS beschrieben, bei dem das entsprechende Racemat mittels Dimethoxystrychnin in das gewünschte (S)-Enantiomere überführt wird. Dieses Verfahren hat den Nachteil, dass das für die Racemattrennung eingesetzte Dimethoxystrychnin zu kostspielig ist.

Die EP-A 0 524 781 beschreibt ein Verfahren zur Herstellung von (S)-HTFMPS bei dem das entsprechende Racemat mittels (S)-(-)- α -Methylbenzylamin in das gewünschte (S)-Enantiomere überführt wird. Nachteilig bei diesem Verfahren ist, dass grosse Mengen an (S)-(-)- α -Methylbenzylamin eingesetzt werden müssen, womit dieses Verfahren ebenfalls zu kostspielig ist.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, ein kostengünstiges und technisch gangbares Verfahren zur Herstellung von (S)- oder (R)-2,2-HTFMPS zur Verfügung zu stellen.

Diese Aufgabe wird mit den erfindungsgemässen Mikroorganismen gemäss Anspruch 1 und Anspruch 11, den Polypeptiden gemäss Anspruch 4 und mit den Verfahren gemäss den Ansprüchen 15 und 16 gelöst.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind demnach aus der Natur selektionierte Mikroorganismen, sogenannte "Wildstämme", Enzymextrakte davon, die aus ihnen isolierten Enzyme mit stereospezifischer Amidohydrolase-Aktivität sowie die aus den "Wildstämmen" isolierte(n) DNA / DNA-Fragmente, die für eine stereospezifische Amidohydrolase codieren. Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind ferner sogenannte gentechnologisch veränderte Mikroorganismen, die diese DNA-Fragmente bzw. Vektoren enthalten. Ein weiterer Gegenstand ist ein Verfahren zur Herstellung von (S)- oder (R)-2,2-HTFMPS und ein Verfahren zur Herstellung von (S)- oder (R)-2,2-HTFMPA unter Verwendung der beschriebenen Mikroorganismen.

Die Erfindung wird durch die nachfolgenden Abbildungen näher erläutert.

Fig. 1 zeigt die Restriktionskarte der isolierten DNA

Fig. 2 zeigt Plasmid pPRS1b

Fig. 3 zeigt Plasmid pPRS2a

Fig. 4 zeigt das pH-Optimum der Amidohydrolase

Fig. 5 zeigt die Michaelis-Menten-Kinetik der Amidohydrolase

Fig. 6 zeigt das Temperaturoptimum der Amidohydrolase

Fig. 7 zeigt den Effekt von Methanol der Amidohydrolase

Die erfindungsgemässen "Wildstämme" können aus Bodenproben, Schlamm oder Abwasser unter Zuhilfenahme üblicher mikrobiologischer Techniken isoliert werden.

Erfindungsgemäss erfolgt die Isolation derart, dass man diese in einem Medium enthaltend das Propionsäureamid der Formel VI in Form des Racemats oder eines seiner optisch aktiven Isomere als einzige Stickstoffquelle mit einer geeigneten Kohlenstoffquelle auf übliche Weise züchtet. Aus der durch Züchtung erhaltenen Kultur werden dann jene selektiert, die stabil sind und das Propionsäureamid der Formel VI als einzige Stickstoffquelle verwerten.

Als geeignete Kohlenstoffquellen können die "Wildstämme" Zucker, Zuckeralkohole oder Carbonsäuren als Wachstumssubstrat nützen. Als Zucker können z. B. Glucose, Arabinose, Rhamnose, Lactose oder Maltose verwendet werden. Als Zuckeralkohole können bspw. Sorbit, Mannit oder Glycerin verwendet werden. Als Carbonsäure kann beispielsweise

Citronensäure verwendet werden. Vorzugsweise wird als Kohlenstoffquelle Glycerin oder Glucose eingesetzt.

Als Selektions- und Anzuchtmedium können die in der Fachwelt üblichen verwendet werden, wie beispielsweise ein Mineralsalzmedium gemäss Kulla et al., Arch. Microbiol. 135, S. 1 - 7, 1983.

Während der Anzucht und Selektion werden zweckmässig die wirksamen Enzyme der Mikroorganismen induziert. Als Enzyminduktor kann das Propionsäureamid der Formel VI in Form des Racemats oder eines seiner optisch aktiven Isomere, Acetamid oder Malonsäurediamid, verwendet werden.

Üblicherweise erfolgt die Anzucht und Selektion bei einer Temperatur von 0 bis 42 °C, vorzugsweise von 20 bis 37 °C und bei einem pH-Wert von 4 bis 9, vorzugsweise bei einem pH-Wert von 6 bis 8.

Bevorzugte "Wildstämme" sind Propionsäureamid (Formel VI) verwertende der Gattung *Klebsiella*, *Rhodococcus*, *Arthrobacter*, *Bacillus* und *Pseudomonas*. Ganz besonders bevorzugt sind Mikroorganismen der Spezies *Klebsiella oxytoca* PRS1 (DSM 11009), *Klebsiella oxytoca* PRS1K17 (DSM 11623) *Pseudomonas* sp. (DSM 11010), *Rhodococcus opacus* ID-622 (DSM 11344), *Arthrobacter ramosus* ID-620 (DSM 11350), *Bacillus* sp. ID-621 (DSM 11351), *Klebsiella planticola* ID-624 (DSM 11354) und *Klebsiella pneumoniae* ID-625 (DSM 11355), sowie deren funktionelle äquivalente Varianten und Mutanten. Dabei weisen die "Wildstämme" *Klebsiella oxytoca* (DSM 11009), *Klebsiella planticola* ID-624 (DSM 11354) und *Klebsiella pneumoniae* ID-625 (DSM 11355) bevorzugt (R)-Amidohydrolase-Aktivität und die "Wildstämme" *Pseudomonas* sp. (DSM 11010), *Rhodococcus opacus* ID-622 (DSM 11344), *Arthrobacter ramosus* ID-620 (DSM 11350) und *Bacillus* sp. ID-621 (DSM 11351) bevorzugt (S)-Amidohydrolase-Aktivität auf. Die Mikroorganismen mit der Bezeichnung DSM 11010, DSM 11009 wurden am 24.06.1996, die Mikroorganismen mit der Bezeichnung DSM 11355, DSM 11354 am 27.12.1996, die Mikroorganismen mit der Bezeichnung DSM 11351, DSM 11350 und DSM 11344 am 13.12.1996 und die Mikroorganismen mit der Bezeichnung DSM 11623 am 20.06.1997 bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroderweg 1b, D-38124 Braunschweig, gemäss Budapester Vertrag hinterlegt.

Unter "funktionell äquivalenten Varianten und Mutanten" der "Wildstämme" werden Stämme verstanden, die im wesentlichen dieselben Eigenschaften und Funktionen wie die

Ursprungsmikroorganismen besitzen. Derartige Varianten und Mutanten können zufällig z. B. durch UV-Bestrahlung gebildet werden oder gezielt durch chemische Mutagenese wie z. B. durch Interkalatoren, wie Acridin-Farbstoffe.

Taxonomische Beschreibung von *Klebsiella oxytoca* PRS1 (DSM 11009)

Zellform	Stäbchen
Breite μm	1,0 - 1,2
Länge μm	1,2 - 2,0
Beweglichkeit	—
Gram-Reaktion	—
Lyse durch 3% KOH	+
Aminopeptidase (Cerny)	+
Sporen	—
Oxidase	—
Catalase	+
Wachstum	
anaerob	+
Gas aus Glucose	+
Säure aus (ASS)	
Glucose	+
Fructose	+
Xylose	+
Erythrit	—
Adonit	+
D-Mannose	+
L-Rhamnose	+
Inosit	+
Sorbit	+
α -Methyl-D-glucosid	+
Cellobiose	+
Maltose	+
Lactose	+
D-Arabitol	+
ONPG	+
ADH	—

5

LDC	w
ODC	—
VP	+
Indol	+
H ₂ S-Bildung	—
Simmons Citrat	+
Urease	+
Methylrot	—
Hydrolyse von	
Gelatine	—
DNA	—
Tween 80	—

Taxonomische Beschreibung von *Pseudomonas* sp. (DSM 11010)

Zellform	Stäbchen
Breite μm	0,7 - 0,8
Länge μm	1,5 - 3,5
Beweglichkeit	+
Gram-Reaktion	–
Lyse durch 3% KOH	+
Aminopeptidase (Cerny)	+
Sporen	–
Oxidase	+
Fluoreszenz	+
Catalase	+
Wachstum bei 41 °C	–
ADH	+
Urease	–
Hydrolyse von Gelatine	+
Nitratreduktion	–
Denitrifikation	–
Levan aus Saccharose	+
Lecithinase	+

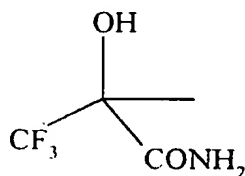
Substratverwertung

Adipat	—
Citrat	+
Malat	+
L-Mandelat	—
Phenylacetat	—
D-Glucose	+
Maltose	—
Trehalose	+
Mannitol	+
Adonitol	+
Acetamid	+
Hippurat	—
Tryptamin	—
Butylamin	—

Abkürzungen:

ASS: Acetylsalicylsäure
ONPG: O-Nitro-phenylgalactosidase
ADH: Alkoholdehydrogenase
LDC: Lactatdecarboxylase
ODC: Ornithindecaboxylase
VP: Voges Proskauer

Das erfindungsgemässe Enzym mit stereospezifischer Amidohydrolase-Aktivität ist beispielsweise aus den bereits beschriebenen "Wildstämmen" erhältlich und befähigt, das Propionsäureamid der Formel



VI

in Form des Racemats oder seines (R)-Isomeren zu hydrolysieren, sowie funktionell äquivalente Varianten und Mutanten davon.

Unter "funktionell äquivalenten Varianten und Mutanten" der Enzyme werden Enzyme verstanden, die im wesentlichen dieselben Eigenschaften und Funktionen besitzen. Derartige Varianten und Mutanten können zufällig z. B. durch Mutation gebildet werden.

Zweckmässig ist das Enzym charakterisiert durch

- ein pH-Optimum von $\text{pH } 10 \pm 0,5$
- ein Temperaturoptimum zwischen 65 und 70 °C bei einem pH-Wert von 10 und
- einem K_M -Wert für das Substrat (R)-2,2-HTFMPA von 32 mM (60 °C in 100 mM CAPS-Puffer (3-(Cyclohexylamino)-1-propansulfonsäure) pH 10),

insbesondere dadurch, dass

- d) eine 5 bis 20% Methanolkonzentration inhibierend wirkt und
- e) die N-terminale Aminosäuresequenz: Met-Lys-Trp-Leu-Glu-Glu-Ser-Ile-Met-Ala-Lys-Arg-Gly-Val-Gly-Ala-Ser-Arg-Lys-Pro ist.

Diese stereospezifische Amidohydrolase kann aus den bereits beschriebenen "Wildstämmen" isoliert werden, die befähigt sind, das Propionsäureamid der Formel VI in Form des Racemats oder seines R-Isomeren als einzige Stickstoffquelle zu verwerten. Zweckmässig wird die Amidohydrolase aus den "Wildstämmen" der Gattung *Klebsiella*, bevorzugt aus *Klebsiella oxytoca* PRS1 (DSM 11009) oder *Klebsiella oxytoca* PRS1K17 (DSM 11623) isoliert.

Selbstverständlich kann dieses Enzym ebenso aus den von diesen "Wildstämmen" abgeleiteten gentechnologisch veränderten Mikroorganismen isoliert werden.

Zur Gewinnung der stereospezifischen Amidohydrolase werden die "Wildstämmen" in einem wässrigen Nährmedium, das eine Kohlenstoff-, Stickstoffquelle, Mineralsalze und eine Vitaminquelle enthält, auf übliche Weise gezüchtet (kultiviert). Zweckmässig werden die "Wildstämmen" bei einer Temperatur von 20 bis 35 °C und bei einem pH-Wert von 6 bis 8 kultiviert. Das Enzym kann dann nach Aufschluss der Zellen z. B. durch die French-Press durch an sich bekannte Methoden der Enzymreinigung isoliert werden.

Die erfindungsgemässe DNA bzw. die erfindungsgemässen DNA-Fragmente, die für eine stereospezifische Amidohydrolase codieren, wie sie insbesondere durch die Aminosäuresequenz in SEQ ID No. 2 dargestellt wird, und die durch die Restriktionskarte gemäss Fig. 1 und insbesondere durch die Nukleotidsequenz in SEQ ID No. 1 charakterisiert sind, umfassen auch deren funktionell äquivalente genetische Varianten und Mutanten, d. h. Gene, die sich von den Genen der Wildtyp-Organismen ableiten und deren Genprodukte in ihrer biologischen Funktion im wesentlichen unverändert sind. Die funktionell äquivalenten genetischen Varianten und Mutanten umfassen somit beispielsweise Basenaustausche im Rahmen der bekannten Degeneration des genetischen Codes, wie sie z. B. künstlich erzeugt werden können, um die Gensequenz an die bevorzugte Codon-Verwendung eines bestimmten Mikroorganismus, in dem eine Expression erfolgen soll, anzupassen. Die genetischen Varianten und Mutanten umfassen auch Deletionen, Insertionen und Substitutionen von Basen oder Codons, soweit die Genprodukte derart veränderter Gene in ihrer biologischen Funktion im wesentlichen unverändert lassen. Umfasst werden hierdurch z. B. Gensequenzen, die zu den Wildtypsequenzen eine hohe Homologie, beispielsweise höher als 70% aufweisen und unter

stringenten Hybridisierungsbedingungen, z. B. bei Temperaturen zwischen 60 und 70°C und bei 0,5 bis 1,5 M Salzanteil, insbesondere bei einer Temperatur von 67 °C und bei 0,8 M Salzanteil mit dem Komplement der Wildtypsequenzen zur Hybridisierung in der Lage sind.

Als Ausgangsmaterial für die erfindungsgemässe DNA können die bereits beschriebenen "Wildstämme" dienen, die als Ausgangsmaterial zur Isolation der erfindungsgemässen stereospezifischen Amidohydrolase eingesetzt werden.

Die Isolierung der intakten Gene bzw. der intakten erfindungsgemässen DNA-Fragmente kann nach bekannten Methoden ausgehend von einer Genbank eines geeigneten Mikroorganismus wie *Klebsiella oxytoca* erfolgen, aus der das Amidohydrolase-Gen, oder Fragmente davon durch Hybridisierung mit markierten Oligonukleotiden, die Teilsequenzen der Amidohydrolase-Gene enthalten, in bekannter Weise isoliert und kloniert werden können. Im folgenden wird das Amidohydrolase-Gen als sad abgekürzt,

Zur Verbesserung der Transkription wird das sad-Gen zweckmässig unter die Kontrolle eines starken Promotors gestellt. Die Wahl des Promotors hängt von den gewünschten Expressionsbedingungen ab, beispielsweise davon, ob eine konstitutive oder induzierte Expression gewünscht wird, oder von dem Mikroorganismus, in dem die Expression erfolgen soll.

Geeignete Promotoren sind die Promotoren P_L und P_R des Phagen Lambda (vgl. Schauder et al., Gene, 52, 279 - 283, 1987), der P_{trc} -Promotor (Amann et al., Gene, 69, 301 - 315, 1988), die Promotoren P_{Nm} , P_{S1} (M. Labes et al., Gene, 89, 37 - 46, 1990), der P_{trp} -Promotor (Amann et al., Gene, 25, 167 - 178, 1983), der P_{lac} -Promotor (Amann et al., Gene, 25, 167 - 178, 1983) und der P_{tac} -Promotor, ein Hybrid aus den genannten P_{trp} - und P_{lac} -Promotoren, der als konstitutiver oder induzierbarer Promotor eingesetzt werden kann (Russel und Bennett, Gene, 20, 231 - 243, 1982). Bevorzugt wird der P_{lac} -Promotor verwendet.

Zur Verwendung bei der Produktion von z. B. (R)-2,2-HTFMPS in einem geeigneten Produktionsstamm werden die erfindungsgemässen DNA-Fragmente zweckmässig mit Hilfe bekannter Techniken in bekannte geeignete Vektoren, vorzugsweise Expressionsvektoren eingebaut.

Als Vektoren können autonom und selbstreplizierende Plasmide oder Integrationsvektoren verwendet werden.

Abhängig von der Art der gewählten Vektoren können die sad-Gene in verschiedenen Mikroorganismen exprimiert werden. Als Vektoren eignen sich sowohl Vektoren mit spezifischem Wirtsspektrum als auch Vektoren mit breitem Wirtsspektrum ("broad host range"). Beispiele für Vektoren mit spezifischem Wirtsspektrum, z. B. für *E. coli* sind pBR322 (Bolivar et al., *Gene*, 2, 95 - 113), der handelsübliche pBLUESCRIPT-KS+[®], pBLUESCRIPT-SK+[®] (Stratagene), pUC18/19 (Yanisch-Perron et al., *Gene* 33, 103 - 119, 1985), pK18/19 (Pridmore, *Gene*, 56, 309 - 312, 1987), pRK290X (Alvarez-Morales et al., *Nucleic Acids Research*, 14, 4207 - 4227) und pRA95 (erhältlich von Nycomed Pharma AS, Hvidovre, Dänemark). Vorzugsweise wird pBLUESCRIPT-KS+[®] angewendet.

Als "broad host range" Vektoren können alle Vektoren eingesetzt werden, die für Gram-negative Bakterien geeignet sind.

Beispiele für solche "broad host range" Vektoren sind pRK290 (Ditta et al., *PNAS*, 77, 7347 - 7351, 1980) oder deren Derivate, pKT240 (Bagdasarian et al., *Gene*, 26, 273 - 282, 1983) oder dessen Derivate, pGSS33 (Sharpe, *Gene*, 29, 93 - 102, 1984), pVK100 (Knauf und Nester, *Plasmid*, 8, 45 - 54, 1982) bzw. dessen Derivate, pME285 (Haas und Itoh, *Gene*, 36, 27 - 36, 1985) bzw. dessen Derivate.

Auf diese Weise wurden beispielsweise die Plasmide pPRS1b (Fig. 2), pPRS2a (Fig. 3), pPRS4 und pPRS7 erhalten.

Zur Herstellung der Produktionsstämme für die Fermentation, d. h. Stämme, die für die Herstellung von z. B. (R)-2,2-HTFMPS eingesetzt werden können, müssen die erfindungsgemässen DNA-Fragmente bzw. Vektoren in die gewünschten und zur Expression geeigneten Wirtsstämme eingebracht werden. Zweckmässig werden die Mikroorganismen hierzu in üblicher und an sich bekannter Weise mit den die erfindungsgemässen DNA-Fragmente enthaltenden Vektoren transformiert. Die Mikroorganismen können das erfindungsgemässe DNA-Fragment dann entweder auf einem Vektormolekül oder integriert in ihrem Chromosom enthalten.

Geeignete Wirtsstämme, vorzugsweise Stämme mit hoher Substrat- und Edukt-Toleranz sind beispielsweise Mikroorganismen der Gattung *Pseudomonas*, *Comamonas*, *Bacillus*, *Rhodococcus*, *Acinetobacter*, *Rhizobium*, *Agrobacterium*, *Rhizobium* / *Agrobacterium* oder *Escherichia*, wobei letztere bevorzugt sind. Besonders bevorzugt sind die Mikroorganismen *Escherichia coli* DH5, *Escherichia coli* XL1-Blue[®] und *Escherichia coli* XL1-Blue MRF[®].

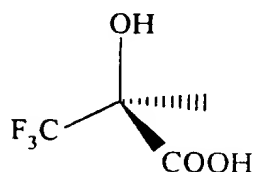
11

Geeignete Produktionsstämme sind somit beispielsweise Mikroorganismen der Spezies *Escherichia coli* DH5 und *Escherichia coli* XL1-Blue MRF'[®], jeweils enthaltend Plasmid pPRS1b, pPRS2a, pPRS4 oder pPRS7.

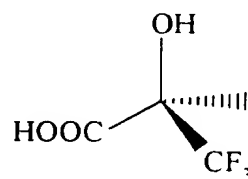
Der Mikroorganismus *Escherichia coli* XL1-Blue MRF'[®]/pPRS2a wurde am 30. 06. 1997 unter der Bezeichnung DSM 11635 bei der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, D-38124 Braunschweig, Mascheroderweg 1b, gemäss Budapester Vertrag hinterlegt.

Die Isolierung der transformierten Wirtsstämme (Produktionsstämme) kann aus einem selektiven Nährmedium erfolgen, dem ein Antibiotikum zugesetzt wird, gegen das die Stämme durch ein auf dem Vektor oder DNA-Fragment befindliches Markiergen resistent sind.

Das erfindungsgemässe Verfahren zur Herstellung von (S)- oder (R)-2,2-HTFMPS der Formeln

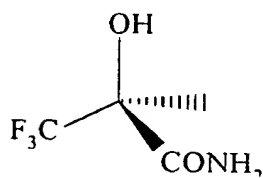


I

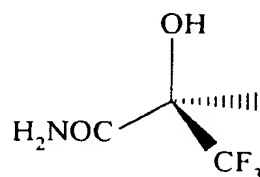


II

und / oder von (R)- oder (S)-2,2-HTFMPS der Formeln

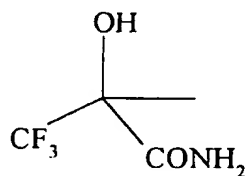


VII



VIII

umfasst die Umsetzung des Propionsäureamids der Formel



VI

mittels den bereits beschriebenen erfindungsgemässen Mikroorganismen bzw. mittels aus den von ihnen isolierten Enzymen mit stereospezifischer Amidohydrolase-Aktivität.

Zweckmässig wird dabei das Verfahren zur Herstellung von (R)-2,2-HTFMPS und / oder von (S)-2,2-HTFMPS mittels den "Wildstämmen der Gattung *Klebsiella*, bevorzugt der Spezies *Klebsiella oxytoca* PRS1 (DSM 11009), *Klebsiella oxytoca* PRS1K17 (DSM 11623), *Klebsiella planticola* ID-624 (DSM 11354), *Klebsiella pneumoniae* ID-625 (DSM 11355), mittels den von diesen "Wildstämmen" abgeleiteten gentechnologisch veränderten Mikroorganismen oder mittels des Enzyms mit einer stereospezifischen Amidohydrolase durchgeführt.

Das Verfahren zur Herstellung von (S)-2,2-HTFMPS und / oder (R)-2,2-HTFMPS wird zweckmässig mittels den "Wildstämmen" der Gattung *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Arthrobacter* oder *Bacillus*, insbesondere der Spezies *Pseudomonas* sp. (DSM 11010), *Rhodococcus opacus* ID-622 (DSM 11344), *Arthrobacter ramosus* ID-620 (DSM 11350) und *Bacillus* sp. ID-621 (DSM 11351) durchgeführt.

Die Biotransformation kann nach üblichem Anzüchten der Mikroorganismen mit ruhenden Zellen (nicht wachsende Zellen, die keine Kohlenstoff- und Energiequelle mehr benötigen) oder mit wachsenden Zellen durchgeführt werden. Vorzugsweise wird die Biotransformation mit ruhenden Zellen durchgeführt.

Für die Biotransformation können fachmännisch übliche Medien eingesetzt werden, wie bspw. niedermolare Phosphatpuffer, HEPES-Puffer oder das zuvor beschriebene Mineralsalzmedium.

Zweckmässig wird die Biotransformation unter einmaliger oder kontinuierlicher Zugabe vom Propionsäureamid (Formel VI) so durchgeführt, dass die Konzentration 10 Gew.%, vorzugsweise 2,5 Gew.% nicht übersteigt.

Der pH-Wert des Mediums kann in einem Bereich von 4 bis 10, vorzugsweise von 5 bis 9,5 liegen. Zweckmässig wird die Biotransformation bei einer Temperatur von 10 bis 60 °C, vorzugsweise von 20 bis 40 °C, durchgeführt.

Die auf diese Weise erhaltene (S)- oder (R)-2,2-HTFMPS bzw. das (S)- oder (R)-2,2-HTFMPS kann durch übliche Aufarbeitungsmethoden wie z. B. durch Extraktion isoliert werden.

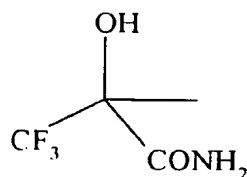
Durch Variation der Nährstoffe im Medium und durch Anpassen der Fermentationsbedingungen an den jeweiligen Mikroorganismus in üblicher Weise kann die Ausbeute an (S)- oder (R)-2,2-HTFMPS bzw. an (S)- oder (R)-2,2-HTFMPA weiter verbessert werden.

Gegebenenfalls wird das (S)- oder (R)-2,2-HTFMPA entweder chemisch in Gegenwart einer Base oder mikrobiologisch mittels Mikroorganismen der Gattung *Rhodococcus* zur entsprechenden Säure hydrolysiert.

Als Base kann ein Alkalimetallhydroxid eingesetzt werden. Als Alkalimetallhydroxid wird zweckmässig Natrium- oder Kaliumhydroxid eingesetzt.

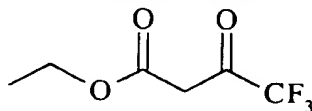
Zweckmässig erfolgt die mikrobiologische Hydrolyse mit Mikroorganismen der Spezies *Rhodococcus equi*, *Rhodococcus rhodochrous* oder *Rhodococcus* sp. S-6 Vorzugsweise mit Mikroorganismen der Spezies *Rhodococcus equi* TG 328 (DSM 6710) bzw. dessen funktionell äquivalente Varianten und Mutanten. Der Mikroorganismus *Rhodococcus equi* TG 328 ist in der US-PS 5 258 305 beschrieben und wurde am 13.09.1991 bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, D-38124 Braunschweig, Mascheroderweg 1b, gemäss Budapester Vertrag hinterlegt. Üblicherweise werden diese Mikroorganismen vor der eigentlichen mikrobiologischen Hydrolyse entsprechend Gilligan et al. (Appl. Microbiol. Biotech., 39, 1993, 720 - 725) angezüchtet. Die mikrobiologische Hydrolyse erfolgt im Prinzip nach fachmännisch üblichen Methoden. Zweckmässig wird die Hydrolyse bei einer Temperatur von 20 bis 40 °C und bei einem pH von 6 bis 9 durchgeführt.

Die Herstellung des Propionsäureamids der Formel



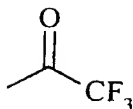
VI

erfolgt derart, dass man zunächst in der ersten Stufe Trifluoracetessigester der Formel



III

mit einer Mineralsäure in Trifluoraceton der Formel



IV

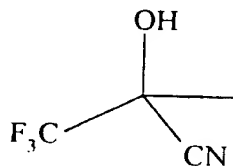
überführt.

Als Mineralsäure kann beispielsweise Salzsäure, Schwefelsäure, Salpetersäure oder Phosphorsäure verwendet werden. Vorzugsweise wird Schwefelsäure, Phosphorsäure oder Salpetersäure, insbesondere Schwefelsäure, verwendet.

Zweckmässig wird die Umsetzung in der ersten Stufe in einem polar protischen Lösungsmittel wie z. B. in einem niederen Alkohol, in Wasser oder in einer niederen Alkohol-Wasser-Mischung durchgeführt. Als niederer Alkohol kann beispielsweise Methanol, Ethanol, Propanol, Isopropanol, Butanol, tert-Butanol oder Isobutanol eingesetzt werden.

Die Umsetzung in der ersten Stufe wird zweckmässig bei einer Temperatur von 50 bis 100 °C, vorzugsweise bei einer Temperatur von 70 bis 95 °C, durchgeführt.

In der zweiten Stufe des erfindungsgemässen Verfahrens wird Trifluoracetone (Formel IV) mit einem Cyanid in das Propionsäurenitril der Formel



V

umgesetzt.

Zweckmässig wird als Cyanid ein Alkalimetallcyanid wie Natrium- oder Kaliumcyanid, vorzugsweise Natriumcyanid, eingesetzt.

Die Umsetzung in der zweiten Stufe wird zweckmässig in Gegenwart einer Mineralsäure durchgeführt. Als Mineralsäure können die gleichen wie die zuvor beschriebenen verwendet werden. Vorzugsweise wird als Mineralsäure Schwefelsäure eingesetzt.

Üblicherweise wird die Mineralsäure im Überschuss bezogen auf Trifluoracetone eingesetzt. Vorzugsweise werden von 1 bis 10 mol Mineralsäure pro mol Trifluoracetone verwendet.

Als Lösungsmittel können die gleichen wie die in der ersten Stufe verwendet werden.

Zweckmässig wird die zweite Stufe bei einer Temperatur von -20 bis 100 °C, vorzugsweise von 0 bis 20 °C durchgeführt.

In der dritten Stufe des erfindungsgemässen Verfahrens wird das Propionsäurenitril der Formel V entweder chemisch in einer konzentrierten Mineralsäure oder mikrobiologisch mittels mutierten Mikroorganismen der Gattung *Rhodococcus* in das Propionsäureamid der Formel VI überführt.

Als Mineralsäuren können die gleichen wie die in der ersten und zweiten Stufe eingesetzt werden. Unter einer "konzentrierten Mineralsäure" wird im folgenden eine 30 bis 100%ige Mineralsäure verstanden. Zweckmässig wird in der dritten Stufe eine 75 bis 100%ige, vorzugsweise eine 90 bis 100%ige Mineralsäure verwendet.

Die chemische Umsetzung in der dritten Stufe wird zweckmässig bei einer Temperatur von 0 bis 160 °C, vorzugsweise von 70 bis 120 °C, durchgeführt.

Die mutierten Mikroorganismen der Gattung *Rhodococcus* enthalten keine Amidase mehr und sind somit nicht mehr befähigt ein Amid in die entsprechende Säure zu überführen. Die Mutation kann nach bekannten Methoden durchgeführt werden (J. H. Miller, *Experiments in Molecular Genetics*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1972, S. 24). Zweckmässige Mutationsmethoden sind die Frameshift-Methode, Deletionsmethode oder Transposon-Insertionsmethode.

Geeignete Mikroorganismen-Spezies für die Mutation sind *Rhodococcus equi*, *Rhodococcus rhodochrous* oder *Rhodococcus* sp. S-6. Vorzugsweise wird der zuvor beschriebene *Rhodococcus equi* TG 328 (DSM 6710) mutiert, wobei *Rhodococcus equi* TG 328-2 (DSM 11636) bzw. dessen funktionell äquivalente Varianten und Mutanten erhalten wird. Der Mikroorganismus TG 328-2 wurde am 30. 06. 1997 bei der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, D-38124 Braunschweig, Mascheroderweg 1b, gemäss Budapester Vertrag hinterlegt. Dieser Mikroorganismus wird unter den gleichen Bedingungen kultiviert wie die bereits zuvor beschriebenen nicht mutierten Mikroorganismen.

Das (R)- und (S)-2,2-HTFMPS sind in der Literatur noch nicht beschriebene Verbindungen und daher ebenfalls Bestandteil der Erfindung. Diese können als neue Zwischenprodukte zur Herstellung von (R)- oder (S)-2,2-HTFMPS, z. B. durch Hydrolyse in Gegenwart einer Base, eingesetzt werden.

Beispiel 1**Herstellung von Trifluoraceton**

500 g (4,9 Mol) konzentrierte Schwefelsäure (96%ig; Merck) wurden zu 1 l destilliertem Wasser gegeben und das Ganze auf 73 °C erhitzt. Dann wurden 500 g (2,69 Mol) Trifluoracetessigester langsam hinzugefügt wobei sich zwei Phasen bildeten. Der Reaktionsansatz wurde bis zur Rückflusstemperatur erhitzt und das dabei gebildete Trifluoraceton abdestilliert. Nach 2 h wurden 293,8 g Trifluoraceton als farblose Flüssigkeit, entsprechend einer Ausbeute von ca. 90%, isoliert. Die GC-Analyse zeigte eine Reinheit von 92,1 %.

Beispiel 2**Herstellung von 2-Hydroxy-2-methyl-3,3,3-trifluormethylpropionsäurenitril**

39,4 g Natriumcyanid (0,763 Mol) wurden zu 174 ml destilliertem Wasser hinzugegeben und das Ganze auf -1 °C gekühlt. Anschliessend wurden 100 g Trifluoraceton (0,822 Mol) tropfenweise hinzugefügt, wobei sich das Reaktionsgemisch auf 6 °C erwärmte. Nach Beendigung der Trifluoraceton-Zugabe wurden bei 4 - 5 °C 293,4 g 6 N Schwefelsäure (1,4916 mol H⁺) hinzugegeben. Danach wurde das Reaktionsgemisch über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Anschliessend wurde mit Ethylether oder mit tert. Butylmethylether extrahiert und die vereinigten organischen Phasen wurden entweder unter Normaldruck bei 32 °C oder unter leichtem Vakuum (300 - 120 mbar) destilliert. Insgesamt wurden 88 g Produkt mit einer Reinheit von 91,2 % (gemessen mittels GC), entsprechend einer Ausbeute von 75,6 %, erhalten.

Beispiel 3**a) Chemische Herstellung von (R,S)-2,2-HTFMPA**

Unter Argon-Atmosphäre wurde 98 %ige Schwefelsäure vorgelegt. Dazu wurden 15 g 2-Hydroxy-2-methyl-3,3,3-trifluormethylpropionsäurenitril (86,9 % gemäss GC) hinzugefügt und die Reaktion wurde auf 95 °C erhitzt. Nach Edukt-Zugabe wurde das Reaktionsgemisch für 15 min auf 114 °C erhitzt. Danach wurde das Reaktionsgemisch auf 5 °C abgekühlt, wobei sich eine dicke braune Lösung bildete. Anschliessend wurden 40 g destilliertes Wasser tropfenweise hinzugegeben. Dabei sollte sich das Reaktionsgemisch nicht über 15 °C erwärmen. Die dabei gebildete gelbliche Suspension wurde 15 min lang auf -15 °C abgekühlt und dann filtriert. Der Filterkuchen wurde mit 20 ml eiskaltem Wasser gewaschen und dann im Vakuum getrocknet. Dabei wurden 12,64 g leicht gelbliches Roh-Produkt erhalten. Anschliessend wurde das Roh-Produkt in 13 ml Ethylacetat zum Rückfluss erhitzt und dann auf Raumtemperatur abgekühlt. Zu dieser Suspension wurden 15 ml Hexan hinzugegeben und das Ganze auf 0 °C abgekühlt. Danach wurde nochmals mit Hexan gewaschen. Nach Trocknen im Vakuum wurden 11,8 g Produkt, entsprechend einer Ausbeute von 80,2 %, erhalten.

Schmp.: 143,1 - 144,3 °C

b) Mikrobiologische Herstellung von (R,S)-2,2-HTFMPA (mittels mutiertem Mikroorganismus der Gattung Rhodococcus)

Zur Mutation wurde *Rhodococcus equi* TG 328 standardgemäss in "Nutrient Broth" mit Acridin ICR 191 über Nacht bei 30 °C inkubiert. Danach wurden die Zellen geerntet und mit 0,9%iger NaCl-Lösung gewaschen. Dann wurden die Zellen in frischem Medium über Nacht bei 30 °C inkubiert.

Die Selektion der mutierten Zellen wurde in einem Mineralsalzmedium gemäss Gilligan et al. (Appl. Microbiol. Biotech., 39, 1993, 720 - 725) in Gegenwart von Fluoracetamid als "counterselektives Agens" durchgeführt. Dieses "counterselektive" Agens tötet nur wachsende Bakterien ab. Die Mutanten, die keine Amidase mehr enthalten und nicht mehr mit (R,S)-2,2-HTFMPA wachsen, überleben und werden angereichert.

Anschliessend wurden die Zellen geerntet, mit 0,9%iger NaCl-Lösung gewaschen, in frischem Medium über Nacht inkubiert und dann ausplattiert. Die Kolonien wurden auf Nitrilhydratase-Aktivität getestet. Die Häufigkeit der gewünschten Mutation war 2%.

Die Mutante von *Rhodococcus equi* TG 328-2 wurde in einem Mineralsalzmedium gemäss Gilligan et al., (ibid) angezüchtet. Die gewaschenen Zellen wurden bei einer

$OD_{650nm} = 5,0$ sowohl mit 2-Hydroxy-2-methyl-3,3,3-trifluormethylpropionsäurenitril-Lösung (1%) als auch mit einer (R,S)-2,2-HTFMFA-Lösung (1%) in 100 mM Phosphatpuffer (pH 7,7) bei 37 °C inkubiert. Nach 16 h wurde mittels GC-Analyse gezeigt, dass das Nitril quantitativ zum Amid umgesetzt wurde, wogegen das Amid nicht zur Säure hydrolysiert wurde.

Beispiel 4

Herstellung von (S)-2,2-HTFMFA und (R)-2,2-HTFMPS mittels eines Mikroorganismus enthaltend eine Amidohydrolase (Wildstamm)

4.1. Selektion und Isolation von Mikroorganismen mit (R)- und (S)-Amidase-Aktivität

Zu 10 g Bodenprobe wurde 100 ml Phosphatpuffer (0,1 M, pH 7,0) hinzugeben und das Ganze 10 Minuten stehen gelassen und filtriert. Danach wurde der Überstand (5,0 ml) oder 1 ml Abwasser (ARA, Visp) in ein Mineralsalzmedium (25 ml; Kulla et al., Arch. Microbiol. 135, S. 1 - 7, 1983) überimpft, welches Glycerin und (R,S)-HTFMFA (Kohlenstoff-/Stickstoff-Verhältnis 5:1) enthielt. Anschliessend wurde diese Kultur inkubiert, bis eine Mischkultur entstanden war, die (R)- und / oder (S)-2,2-HTFMFA als einzige Stickstoff-Quelle benutzen kann. Diese Kultur wurde dann mehrmals überimpft und bei 30 °C bebrütet bis eine Mischkultur entstanden war.

Die Reinkultur dieser Mikroorganismen wurde unter Zuhilfenahme traditioneller mikrobiologischer Techniken erhalten.

Die auf diese Weise erhaltenen Mikroorganismenstämme wurden dann auf Agar-Platten für ihr Wachstum auf (R,S)-2,2-HTFMFA getestet. Die positiven Stämme wurden weiter getestet. Mit diesen Stämmen wurde dann ein Vorkultur-Medium angeimpft. Die in dieser Vorkultur enthaltenen Mikroorganismen wurden ins Mineralsalzmedium überführt und dann auf ihre Fähigkeit überprüft, selektiv (R)-2,2-HTFMFA und / oder (S)-2,2-HTFMFA als einzige Stickstoff-Quelle zu nutzen, wobei der Überstand mittels GC auf die Bildung von (R)-2,2-HTFMPS oder (S)-2,2-HTFMPS und auf die Anreicherung eines der beiden Amid-Enantiomere geprüft wurde.

4.2. Aktivitätsbestimmung der (R)- oder (S)-2,2-HTFMFA-Amidohydrolase

Zur Aktivitätsbestimmung der Hydrolasen wurde die Mikroorganismensuspension auf eine optische Dichte von 4,0 bei 650 nm eingestellt. Als Medium diente ein Phosphatpuffer (100 mmolar), pH 7,0, mit 0,5 Gew.% (R,S)-HTFMFA. Diese Suspension wurde 2 h bei

30 °C unter Schütteln inkubiert. Das durch die Hydrolase freigesetzte NH_4^+ wurde entweder kolorimetrisch oder mittels einer Ammonium-Elektrode bestimmt und das HTFMMPA wurde mittels GC gemessen. Die Aktivität wurde als g (R)- oder (S)-HTFMMPA umgesetzt/l/h/optische Dichte bei 650 nm ausgedrückt, vorausgesetzt, dass 1 mmol gebildetes NH_4^+ = 1 mmol umgesetztem HTFMMPA entspricht.

Tabelle 1: Die Hydrolase-Aktivität von Klebsiella und Pseudomonas

Stamm	Hydrolase-Aktivität	
	(R)-spezifische (g/l/h/O.D. 650 nm)	(S)-spezifische (g/l/h/O.D. 650 nm)
DSM 11009 (Klebsiella oxytoca PRS1)	0,11	-
DSM 11010 (Pseudomonas sp.)	-	0,09

4.3. Herstellung von (S)-2,2-HTFMMPA und (R)-2,2-HTFMPS.

Klebsiella oxytoca PRS1 (DSM 11009), Klebsiella planticola ID-624 (DSM 11354) oder Klebsiella pneumoniae ID-625 (DSM 11355) wurden auf Mineralsalzmedium-Agar-Platte mit Glycerin als Kohlenstoff-Quelle und (R,S)-2,2-HTFMMPA als einzige Stickstoff-Quelle 2 Tage lang bei 30 °C bebrütet. Die Zusammensetzung des Mineralsalzmediums ist in Kulla et al., Arch. Microbiol., 135, S. 1 - 7, 1983 beschrieben. Mit diesen ausplattierten Mikroorganismen wurde ein Vorkultur-Medium mit der gleichen Zusammensetzung beimpft und 2 Tag lang bei 30 °C inkubiert.

Das gleiche Mineralsalzmedium (600 ml) wurde mit 50 ml Vorkultur zur Induktion und Biomassen-Produktion beimpft und bei 30 °C 21 h lang inkubiert. Anschliessend wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet und in 0,1 M Phosphatpuffer, pH 7.0 aufgenommen. Nach Resuspension der Zellen in 0,05M Phosphat Puffer (500 ml, pH 8.0) wurde ein optische Dichte bei 650 nm von 10 eingestellt und 1,0 Gew.% (R,S)-2,2-HTFMMPA zugefügt. Nach einer Inkubation von ca. 5,5 h bei 40 °C wurde (R)-2,2-HTFMMPA vollständig zur entsprechenden Säure umgesetzt, was einer optischer Reinheit (ee) von 100% und einer Ausbeute von 48%.

Der Reaktionsablauf wurde anhand der NH_4^+ -Freisetzung und anhand von GC-Analyse des Überstandes.

4.4. Herstellung von (S)-2,2-HTFMPS und (R)-2,2-HTFMPS mittels eines Mikroorganismus enthaltend eine (S)-Amidohydrolase

In analoger Weise zu Beispiel 4.1. wurde der Mikroorganismen *Pseudomonas* sp. (DSM 11010), *Rhodococcus opacus* ID-622 (DSM 11344), *Arthrobacter ramosus* ID-620 (DSM 11350) und *Bacillus* sp. ID-621 (DSM 11351) isoliert. Die Induktionsdauer betrug 2 Tage unter ansonst gleichen Bedingungen wie Beispiel 4.3..

Im Gegensatz zu Beispiel 4.3 wurde die Biotransformation bei diesen Mikroorganismen mit 0,5 Gew.% (R,S)-2,2-HTFMPS durchgeführt. Der Stamm *Pseudomonas* sp. (DSM 11010) besitzt eine (S)-spezifische Hydrolase und die Aktivität der Hydrolase wurde bei pH 6,0 zu 0,09 g (S)-2,2-HTFMPS (ee = 86%), umgesetzt/l/h/O.D. 650 nm bestimmt.

4.5. Aufarbeitung von (S)-2,2-HTFMPS und (R)-2,2-HTFMPS

a) mittels Extraktion

196 ml einer Reaktionsmischung enthaltend (S)-2,2-HTFMPS und (R)-2,2-HTFMPS (erhalten aus Beispiel 4.3) 0,1 M Phosphatpuffer (250 ml), pH 10, wurden 3 mal mit Ethylacetat (200 ml) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit Na_2SO_4 getrocknet und dann bei 40 °C und 50 mbar eingedampft. Auf diese Weise wurden 912 mg feuchtes Produkt erhalten. Dieses wurde in heissem Ethylacetat (1,3 ml) gelöst und die Lösung dann auf Raumtemperatur abgekühlt. Nach Zugabe von Hexan (2 ml) fiel das Produkt aus. Die Mischung wurde auf 0 °C abgekühlt, das Produkt filtriert und dann im Vakuum bei 50 °C getrocknet. Dabei wurden 791 mg des (S)-2,2-HTFMPS erhalten, entsprechend einer Ausbeute von 78,2 % bez. der halben eingesetzten Menge. Mittels chiraler GC-Analyse wurde nur das (S)-Isomere identifiziert.

Die verbleibende Wasserphase wurde mit konz. HCl auf pH 1 eingestellt und dann 2 mal mit Ethylacetat (200 ml) extrahiert. Die Extrakte wurden bei 40 °C eingedampft und dann getrocknet. Dann wurde 1 ml Toluol hinzugegeben und das Ganze auf Raumtemperatur abgekühlt. Es wurden nochmals 2 ml Hexan hinzugegeben und das Ganze auf 0 °C gekühlt. Der Feststoff wurde 2 - 3 mal mit Hexan gewaschen und dann getrocknet. Insgesamt wurden aus der Wasserphase nach Trocknen im Vakuum bei 35 °C 664 mg (R)-2,2-HTFMPS erhalten, entsprechend einer Ausbeute von 65,7 % bez. der halben eingesetzten Menge. Mittels chiraler GC-Analyse wurde nur das (R)-Isomere identifiziert.

b) mittels Elektrodialyse (direkte Isolation von (S)-HTFMPS

Eine Reaktionsmischung enthaltend (S)-2,2-HTFMPS und (R)-2,2-HTFMPS (erhalten aus Beispiel 4.3) wurde der Ultrafiltration unterworfen, um zelluläres Material zu entfernen. Die daraus resultierende Lösung wurde der Elektrodialyse unterworfen. Dabei wanderte das (R)-2,2-HTFMPS und alle Puffersalze durch die Membran hindurch. Nach Beendigung der Elektrodialyse wurde eine Lösung von reinem (S)-2,2-HTFMPS (2342,2 g) erhalten. Diese Lösung wurde bei 135 °C und 20 mbar destilliert bis 447 g Produkt erhalten wurden. Dann wurden 32,7 g festes NaOH (0,8 mol) hinzugegeben und die Reaktionsmischung wurde für 3 h auf Rückflusstemperatur erhitzt. Nach dieser Zeit war das (S)-2,2-HTFMPS vollständig zur (S)-2,2-HTFMPS umgesetzt. Die Lösung wurde auf eine Temperatur von unterhalb 25 °C abgekühlt und der pH mit 93,6 g konz. HCl von pH 13,8 auf pH 1,0 eingestellt. Die wässrige Phase wurde 2mal mit Acetessigester (500 ml) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit Na₂SO₄ getrocknet und dann filtriert. Die Lösung wurde am Rotationsverdampfer bis zu einer dicken Suspension eingedampft. Zur Suspension gab man 2mal je 20 ml Toluol, um dann die dabei erhaltene Suspension nochmals einzuengen. Dann wurden nochmals 10 ml Toluol hinzugefügt, um das Ganze zum Rückfluss zu erhitzen. Die Lösung wurde auf Raumtemperatur abgekühlt und Hexan (30 ml) wurde hinzugegeben bis das Produkt präzipitierte. Die Suspension wurde auf -10 °C abgekühlt und das Produkt mittels Ultrafiltration gesammelt. Nach Trocknen im Vakuum (Temperatur < 35 °C) wurden 14,1 g (0,0892 mol) reine (S)-2,2-HTFMPS (ee-Wert 99,7%) entsprechend einer Ausbeute von 35% (berechnet ausgehend von der Hälfte des Eduktes), erhalten.

Beispiel 5**a) Chemische Hydrolyse von (S)-2,2-HTFMPS zu (S)-2,2-HTFMPS**

0,47 g Natriumhydroxid (11,6 mMol) wurden in 5 ml destilliertes Wasser gegeben. Hierzu wurden 650 mg (4,14 mMol) (S)-2,2-HTFMPS hinzugefügt und das Ganze auf Rückflusstemperatur erhitzt. Nach 2 h wurde die Reaktionsmischung auf Raumtemperatur abgekühlt und der pH mit 10%iger HCl auf pH 1,0 eingestellt. Anschliessend wurde die Mischung 2 mal mit Ethylacetat (10 ml) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und bei maximal 40 °C eingedampft. Nach Trocknen im Vakuum-Ofen (45 min bei 35 °C) wurden 618 mg (S)-2,2-HTFMPS, entsprechend einer Ausbeute von 94,4 %, erhalten. Mittels chiraler GC-Analyse wurde nur das eine Isomere identifiziert.

b) Mikrobiologische Hydrolyse von (S)-2,2-HTFMPA zu (S)-2,2-HTFMPS

Rhodococcus equi TG 328 (DSM 6710) wurden in einem Mineralsalzmedium gemäss Gilligan et al., (ibid) angezüchtet. Die gewaschenen Zellen mit einer $OD_{650nm} = 5,0$ wurden mit einer (S)-2,2-HTFMPA-Lösung (1% in 100 mM Phosphatpuffer, pH 7,7) bei 37 °C inkubiert. Nach 16 h wurde mittels GC-Analyse gezeigt, dass das (S)-2,2-HTFMPA quantitativ in die (S)-2,2-HTFMPS überführt wurde.

Beispiel 6**6.1 Erzeugung eines Kapsel-negativen Mutanten von *Klebsiella oxytoca* PRS1**

Klebsiella oxytoca PRS1 bildete eine Schleimkapsel, die dem Stamm ungünstige Eigenschaften bei der Fermentation verlieh. Ein Kapsel-negativer Stamm war vorteilhaft für die Zellabtrennung und die nachfolgende Aufarbeitung.

Kapsel-negative Mutanten wurden mittels Acridine ICR 191 (J. H. Miller Experiments in Molecular Genetics, Cold Springs Harbor, 1972), wie nachfolgend beschrieben, isoliert.

Klebsiella oxytoca PRS1 wurde im Mineralsalzmedium enthaltend 0,2% Glucose und in Anwesenheit von Acridine ICR 191 angeimpft und über Nacht bei 30 °C bebrütet. Anschliessend wurde diese Kultur in frisches Medium überimpft und nochmals über Nacht bei 30 °C bebrütet. Die Kultur wurde verdünnt und auf Nutrient Agar ausplattiert. Nicht schleimige Kolonien wurden gepickt und überprüft. Die Mutanten wurden mit einer Frequenz von 0,18% isoliert. Ein Beispiel solcher Mutanten ist *Klebsiella oxytoca* PRS1K17 (DSM 11623). Diese Mutante zeigte das gleiche Wachstumsverhalten wie der Wildtyp. Das (R)-spezifische Enzym besitzt die gleiche Aktivität wie in *Klebsiella oxytoca* PRS1 aber der Stamm bildete keine Schleim-Kapsel. Diese Mutante wurde für die Enzymcharakterisierung und die Genklonierung benutzt.

6.2 Präparation chromosomaler DNA von *Klebsiella oxytoca* PRS1K17 (Kapsel-negative Mutante von PRS1)

Die chromosomale DNA einer frischen Übernachtskultur von *Klebsiella oxytoca* PRS1K17 (100 ml Nutrient Yeast Broth, 30 °C) wurde nach der modifizierten Methode von R.H. Chesney et al. (J. Mol. Biol., 130, 1979), 161 - 173) isoliert:

Die abzentrifugierten Zellen (15 min, 6'500 x g, 4 °C) wurden in Tris-Puffer (2,25 ml, 0,05 mol/l, pH 8,0, 10% (w/v) Saccharose resuspendiert.

Nach Zugabe von 375 µl Lysozymlösung (10 mg/ml; 0,25 mol/l Tris-HCl-Puffer, pH 8,0) und 900 µl 0,1 mol/l EDTA, pH 8,0, wurde die Suspension für 10 min auf Eis gekühlt. Darauf folgte die Zugabe von 450 µl 5% (w/v) SDS und von 50 µl Ribonuklease (10 mg/ml H₂O) und eine Inkubation bei 37 °C für 30 min. Die Inkubation wurde nach Zugabe einer Spatelspitze Proteinase K und 400 µl Pronase (20 ml/ml H₂O) für 2 h fortgesetzt. Es wurde nach Mischen mit 4,3 g CsCl zentrifugiert (30 min, 40'000 x g, 20 °C), mit 250 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml) versetzt und in der Ultrazentrifuge (Vti 65.2-Röhrchen) zentrifugiert (mehr als 8 h, 246'000 x g, 20 °C). Unter langwelligem UV-Licht wurde die DNA-Bande aus dem Röhrchen abgesaugt. Nach Zugabe des 4-fachen Volumens TE-Puffer (10 mmol/l Tris-HCl, pH 8,0, 1 mmol/l EDTA) wurde das Ethidiumbromid dreimal mit Wasser gesättigtem n-Butanol extrahiert. Die DNA wurde mit Isopropanol präzipitiert, in TE-Puffer aufgenommen und 15 min bei 65 °C inkubiert. Das Präparat konnte bei 4 °C aufbewahrt werden.

6.3 Restriktion und Ligation der chromosomalen DNA

5 µg *Klebsiella oxytoca* PRS1K17-DNA und 4,5 µg Vektor-DNA (pBLUESCRIPT-KS+®) wurden jeweils mit 20 Units Restriktionsenzym HindIII in einem Totalvolumen Restriktionspuffer von 100 µl geschnitten (6,5 h bei 37 °C). Die DNAs wurden mit Ethanol präzipitiert und im Speed Vac^R Concentrator getrocknet. Die Niederschläge wurden im Ligationpuffer (20 mmol/l Tris-Puffer, 10 mmol/l DTT (Dithiothreitol), 10 mmol/l MgCl₂, 0,6 mol/l ATP (Adenosintriphosphat, pH 7,2) aufgenommen und vereinigt (Ligationsvolumen 100 µl).

Nach Zugabe von 1 Unit T4-DNA-Ligase wurde über Nacht bei 13 °C inkubiert. Die DNA des Ligationsgemisches wurde mit Isopropanol präzipitiert und in 30 µl Wasser zur Transformation aufgenommen.

6.4 Transformation von *E. coli* XL1-Blue MRF[®] und Selektion

Kompetente Zellen von *E. coli* XL1-Blue MRF[®] wurden mittels Elektroporation mit dem Ligationsgemisch nach der beschriebenen Methode von S. Fiedler und R. Wirth (Analyt. Biochem., 170, 1988, 38-44) transformiert.

Zum Plasmidnachweis wurde auf Nutrient Agar mit Ampicillin (100 µg/ml) und zum "Insert"-Nachweis mit 0,5 mmol/l IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalaktosid) und X-Gal (30 µg/ml, 5-Brom-4-chlor-3-indolyl-β-D-galaktopyranosid) bei Inkubation bei 37 °C selektioniert.

Bei einer Transformationsfrequenz von $1,7 \times 10^8$ cfu/ml ("colony forming units" $\hat{=}$ lebenden Zellen) besaßen nahezu alle Klone ein HindIII "Insert".

Beispiel 7**Screening der *Klebsiella oxytoca* PRS1K17-Genbank nach dem (R)-spezifischen Amidohydrolase-Gen**

Klone mit Hybridplasmiden (HindIII "Insert") wurden auf Minimalmedium-Agar nach H. Kulla et al. (Arch. Mikrobiol., 135, 1983, 1-7) mit 0,4% (v/v) Glycerin als C-Quelle, 0,2% (w/v) (R,S)-2,2-HTFMPA als einzige N-Quelle und Ampicillin (5 µg/ml) zur Plasmidstabilisierung, auf ihre Wachstumsfähigkeit überprüft. Nur Klone, welche das intakte Amidohydrolase-Gen sad auf dem DNA-"Insert" im Plasmid enthielten, waren fähig, das (R,S)-HTFMPA als N-Quelle zu verwerten, dieses in die gesuchte (R)-Säure umzusetzen und auf diesem Minimalmedium zu wachsen. Solchermassen selektionierte Klone enthielten alle ein Hybridplasmid aus Vektor pBLUESCRIPT-KS+® mit einem HindIII "Insert" von ca. 2,73 kb.

Auf diese Weise wurde der Stamm *E. coli* XL1-Blue MRF'® mit dem als pPRS2a bezeichneten Plasmid identifiziert, aus dem das Plasmid pPRS2a isoliert und näher charakterisiert wurde.

Beispiel 8**Lokalisation des Amidohydrolase-Gens (sad) auf dem klonierten HindIII-Fragment****8.1 Restriktionskarte von pPRS2a**

Durch Restriktionsanalyse nach herkömmlichem Vorgehen (Current Protocols Molecular Biology, John Wiley and Sons, New York, 1987, Abschnitt 2, wurde eine grobe Restriktionskarte vom pPRS2a bezüglich XhoI, DraII, SmaI, PstI, SalI, BamHI erstellt. Fig. 1 zeigt die Restriktionskarte.

8.2 Formulierung von gemischten DNA-Oligomeren beruhend auf der N-terminalen Peptidsequenz der Amidohydrolase

Aufgrund des genetischen Codes konnte ein gemischtes DNA-Oligomer für die N-terminale Peptidsequenz der *Klebsiella oxytoca* PRS1K17 Amidohydrolase formuliert und mit einer DNA-Synthese-Maschine synthetisiert werden:

LON T-4

5' CAK CAK CTN ACN GAR GAR ATG CA 3'

AS His His Leu Thr Glu Glu Met

AS = Aminosäuresequenz

8.3 "Southern Blot-Hybridisierung" von Restriktionsfragmenten des Plasmids pPRS2a

Die über Agarosegel-Elektrophorese (0,6%) aufgetrennten DNA-Fragmente, die nach unterschiedlichen Restriktionen (BamHI, SmaI, DraII, HindIII, EcoRI) von pPRS2a erhalten wurden, wurden über das bekannte "Southern Blot-Verfahren" auf Nitrocellulose übertragen (Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, New York, 1987, Abschnitt 2.9ff).

Die DNA-Oligomere wurden gleichermassen mit Digoxigenin 3'-endmarkiert.

Die Hybridisierung gegen die "Southern Blots" erfolgte nach dem bekannten Vorgehen (in der oben genannten Literaturstelle).

Durch Hybridisierung gegen das der N-terminalen Proteinsequenz entsprechende Nukleotid-Oligomer konnte ein 1,44 kb grosses SmaI-BamHI-DNA-Fragment oder ein 1,52 kb grosses DraII-BamHI-DNA-Fragment auf dem Hybridplasmid pPRS2a markiert werden.

8.4 Subklonierungen des Hydrolase-Gens (sad)

Das 1,52 kb grosse DraII-BamHI-DNA-Fragment, oder das 1,91 kb grosse PstI-BamHI-DNA-Fragment, welches für die (R)-spezifische Amidohydrolase aus *Klebsiella oxytoca* PRS1K17 codiert, wurde in gleichermassen verdaute Vektor-DNA pBLUESCRIPT-KS+[®] inseriert.

Der Vektor pBLUESCRIPT-KS+[®] mit dem 1,52 kb grossen DraII-BamHI-DNA-Fragment wurde als Hybridplasmid pPRS7 bezeichnet. Der Vektor pBLUESCRIPT-KS+[®] mit dem 1,91 kb grossen PstI-BamHI-DNA-Fragment wurde als Hybridplasmid pPRS4 bezeichnet.

8.5 Sequenzierung des Hydrolase-Gens (sad)

Das weiter oben unter 8.3 beschriebene 1,44 kb große SmaI-BamHI-Fragment wurde mit Hilfe eines Laser-Fluoreszenz-DNA-Sequenators einer Fluoreszenz-Sequenzierung gemäß der modifizierten Didesoxymethode nach Sanger unterworfen. Auf diese Weise wurde die als SEQ ID No. 1 bezeichnete Nukleotidsequenz bestimmt, aus der sich für die Amidohydrolase die separat unter SEQ ID No. 2 dargestellte Aminosäuresequenz ableitet

Beispiel 9**Aktivitätsbestimmung der (R)-Amidohydrolase-Klone**

Die Aktivitätsbestimmung wurde analog zu Beispiel 4.2 durchgeführt.

Die Ergebnisse mit *E. coli* / pPRS1b und *E. coli* / pPRS2a als Beispiel sind in Tabelle 2 zusammengestellt.

Klon	Hydrolase-Aktivität		Stunden (h)
	(R)-Amid g / l	(S)-Amid g / l	
<i>E. coli</i> XL1-Blue MRF [®] / pPRS1b (EcoRI-Klon)	5,35	5,92	0
<i>E. coli</i> XL1-Blue MRF [®] / pPRS1b (EcoRI-Klon)	0,00	5,84	4
	~ Anfangsakti- vität (37 °C) von 0,29 g / l / h / OD _{650nm}		
<i>E. coli</i> XL1-Blue MRF [®] / pPRS2a (HindIII-Klon)	5,66	5,92	0
<i>E. coli</i> XL1-Blue MRF [®] / pPRS2a (HindIII-Klon)	0,00	6,20	8
	~ Anfangsakti- vität (37 °C) von 0,13 g / l / h / OD _{650nm}		

Beispiel 10**Enzymreinigung und Enzymcharakterisierung****10.1 Enzymreinigung**

Während der Reinigung wurden die aktiven Fraktionen kolorimetrisch bestimmt. Danach wurde die Aktivität des zellfreien Extraktes und des reinen Enzyms mittels GC-Methode ermittelt. Zellen von *Klebsiella oxytoca* PRS1 (200 ml; $OD_{650}=21$ in 100 mM Phosphatpuffer, pH 7,5) wurden durch 3maliges Passieren durch die French-Presse bei 19000 psi (1309 bar) aufgebrochen. Benzonase ($1 \mu\text{l} \times 30 \text{ ml Extrakt}^{-1}$) wurde hinzugefügt und dann wurde das Extrakt für 15 min bei $100000 \times g$ 1 h zentrifugiert. Der Überstand ($2,94 \text{ mg} \times \text{ml}^{-1}$) wurde 10 min auf 80°C erhitzt und dann das präzipitierte Protein durch Zentrifugation entfernt. Der Überstand ($170 \text{ ml}, 0,83 \text{ mg} \times \text{ml}^{-1}$) wurde auf eine HiLoad Q-Sepharose 26/10-Chromatographie-Säule (Pharmacia) aufgetragen, welche zuvor mit 50 mM Phosphatpuffer (pH 7,5; Puffer A) äquilibriert worden war. Ungebundenes Protein wurde mit 130 ml Puffer A von der Säule gewaschen. Dann wurde ein linearer Gradient ($500 \text{ ml}; 1 \text{ M NaCl} - 0 \text{ M NaCl}$ in Puffer A) angelegt, wobei die Durchflussrate $2,5 \text{ ml} \times \text{min}^{-1}$ betrug. 5 ml Fraktionen wurden gesammelt und auf Aktivität getestet. Die aktivsten Fraktionen (30 - 37; 40 ml) wurden vereinigt, mittels Ultrafiltration zu 7,5 ml konzentriert und dann wurde der Puffer gegen einen 10 mM Phosphatpuffer (pH 7,5) durch Gelfiltrationschromatographie (Sephadex G-25 M, PD 10, Pharmacia) ausgetauscht. Anschliessend wurden die aktiven Fraktionen auf eine Hydroxyapatit-Säule ($5 \text{ ml}; \text{Bio-Scale CHTI, BioRad}$), welche mit einem 10 mM Phosphatpuffer äquilibriert worden war, aufgetragen. Mittels eines Gradienten ($90 \text{ ml}; 0,5 \text{ mM Phosphatpuffer} - 10 \text{ mM Phosphatpuffer, pH 7,5}$) wurden 1 ml-Fraktionen bei einer Durchflussrate von $2,0 \text{ ml} \times \text{min}^{-1}$ gesammelt und auf Aktivität getestet. Die Fraktionen 17 - 25 und 32 - 34 hatten Aktivität. Das Protein ($M_r 37000$) von Fraktion 19 und den Fraktionen 33 und 34 war gemäss SDS-PAGE rein. Das Protein von Fraktion 20 war mehr als 95 % rein. Die Fraktionen 20 - 25 wurden vereinigt, auf $200 \mu\text{l}$ konzentriert und dann auf eine Gelfiltrationschromatographie-Säule (Superose 12; Pharmacia) aufgetragen. Gemäss SDS-PAGE waren die Fraktionen 23 - 26 rein.

10.2 Proteinsequenzierung

Eine N-terminale Aminosäuresequenz wurde vom Western-Blott erhalten, dann wurde das Protein mit Trypsin verdaut, die Peptide mittels HPLC isoliert und sequenziert.

- N-Terminus: Met Lys Trp Leu Glu Glu Ser Ile Met Ala Lys Arg Gly Val Gly Ala Ser Arg
Lys Pro (SEQ ID Nr. 3)
- T3: Val Tyr Trp Ser Lys (SEQ ID Nr. 4)
- T4: Lys Pro Val Thr His His Leu Thr Glu Glu Met Gln Lys (SEQ ID Nr. 5)
- T5: Tyr Thr Val Gly Ala Met Leu Asn Lys (SEQ ID Nr. 6)
- T6A: Met Glu Asn Ala Glu Asn Ile Met Ser Ile Gly Ser Ala Arg (SEQ ID Nr. 7)
- T7: Trp Leu Glu Glu Ser Ile Met Ala Lys (SEQ ID Nr. 8)
- T8: Met Pro Phe Leu Asn Pro Gln Asn Gly Pro Ile Met Val Asn Gly Ala Glu Lys
(SEQ ID Nr. 9)
- T9-2: Asp Ala Phe Glu Gly Ala Ile Asn Ser Glu Gln Asp Ile Pro Ser Gln Leu Leu
Lys (SEQ ID Nr. 10)
- T9-2: Glu Phe His Tyr Thr Ile Gly Pro Tyr Ser Thr Pro Val Leu Thr Ile Glu Pro Gly
Asp Arg (SEQ ID Nr. 11)
- T11: Leu Phe Ile Gly Asp Ala His Ala Glu Gln Gly Asp Gly Glu Ile Glu Gly Thr
Ala Val Glu Phe Ala (SEQ ID Nr. 12)
- T13-1: Gly Asp Val Leu Ala Val Tyr Ile Glu Ser Met Leu Pro Arg (SEQ ID Nr. 13)
- T13-2: Gly Val Asp Pro Tyr Gly Ile Glu Ala Met Ile Pro His Phe Gly Gly Leu Thr
Gly Thr Asp Leu Thr Ala Met Leu Asn Asp Gln Leu Gln Pro Lys (SEQ ID
Nr. 14)

10.3 Enzymcharakterisierung

Zur Amidasecharakterisierung wurde ein hitzebehandeltes zellfreies Extrakt eingesetzt. Zellen von *Klebsiella oxytoca* PRS1K17 (DSM 11623) ($OD_{650}=160$) wurden durch Passieren durch die French-Presse bei 19000 psi (1309 bar) aufgebrochen. Benzonase ($1\ \mu\text{l} \times 30\ \text{ml Extrakt}^{-1}$) wurden hinzugefügt und dann wurde das Extrakt bei $20000 \times g$ 1 h lang zentrifugiert. Der Überstand ($\text{ca. } 20\ \text{mg} \times \text{ml}^{-1}$ Protein) wurde für 10 min auf $70\ ^\circ\text{C}$ erhitzt und dann wurde das präzipitierte Protein durch Zentrifugation entfernt. Der Überstand ($\text{ca. } 2,0\ \text{mg} \times \text{ml}^{-1}$) wurde auf $5,0\ \text{mg} \times \text{ml}^{-1}$ Protein konzentriert und dann bei $-20\ ^\circ\text{C}$ aufbewahrt. Der Hitzeschritt entfernte ca. 90 % unerwünschtes Protein.

Die Reaktionsrate war bis zu einer Proteinkonzentration von $0,5\ \text{mg} \times \text{ml}^{-1}$ direkt proportional zur Proteinkonzentration. Daher wurde routinemässig eine Proteinkonzentration von $0,2\ \text{mg} \times \text{ml}^{-1}$ für die Tests eingesetzt. Für die Bestimmung des pH-Optimums lag die

Konzentration an (R,S)-2,2-HTFMPA (Substrat) bei 0,5 % (32 mM) und die Temperatur betrug 40 °C. Für den Test wurden die in Tabelle 4 aufgeführten Puffer eingesetzt.

Tabelle 4

Puffer	pH
100 mM MES	6,5
100 mM HEPES	7,0; 7,5
50 mM Phosphatpuffer	8,0; 8,5
50/100 mM Trispuffer	8,0; 8,5
50/100 mM Boratpuffer	9,0; 9,5
50/100 mM CAPS-Puffer	10,0; 10,5; 11,0

Der Effekt der Temperatur auf die Reaktion wurde in 100 mM CAPS-Puffer (pH 10,0) bei einer Substratkonzentration von 0,5 % (32 mM) bestimmt. Der Effekt auf die Substratkonzentration wurde bei 60 °C in 100 mM CAPS-Puffer (pH 10,0) und der Effekt von Methanol bei 40 und 60 °C bei einer Substratkonzentration von 1 % (64 mM) in 100 mM CAPS-Puffer (pH 10,0) bestimmt. Der K_M -Wert der Reaktion wurde mit dem Enzfitter-Programm von Biosoft ermittelt.

Fig. 4 zeigt das pH-Optimum. Das pH-Optimum liegt zwischen 9,5 und 10,5 (100 mM CAPS-Puffer; Substratkonzentration 32 mM).

Fig. 5 zeigt die Michaelis-Menten-Kinetik. Der K_M -Wert liegt bei 32 mM für (R)-2,2-HTFMPA (60 °C in 100 mM CAPS-Puffer, pH 10).

Fig. 6 zeigt das Temperaturoptimum. Das Temperaturoptimum liegt bei 70 °C (100 mM CAPS-Puffer; Substratkonzentration 32 mM).

Fig. 7 zeigt den Effekt von Methanol. Methanol-Konzentrationen zwischen 5 und 20 % inhibierten die Reaktion

10.4 Enzymimmobilisation

Das hitzebehandelte zellfreie Extrakt wurde mit Eupergit C (Röhm GmbH) immobilisiert. Hierzu wurde Eupergit C (3,0 g) zu 15 ml hitzebehandeltem zellfreiem Extrakt (Proteinkonzentration: 51 mg) in 1 M Kaliumphosphatpuffer (pH 8,0) hinzugegeben. Die Mischung wurde bei Raumtemperatur unter leichtem Rühren 90 h lang inkubiert. Das

immobilisierte Enzym wurde filtriert und 4mal mit 20 ml 100 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 8,0) gewaschen. Gebundenes Enzym am Träger (49 mg) ergab 9,5 g Feuchtgewicht an immobilisiertem Enzym, welches in 100 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 10,0) bei 4 °C aufbewahrt wurde. Um die Aktivität und die Stabilität des immobilisierten Enzyms zu testen, wurden 5 g (25 mg Protein) in eine kleine Chromatographiesäule gefüllt. Um das Substrat (100 ml 4 %iges racemisches Amid in 100 mM CAPS-Puffer (pH 10)) zwischen Säule und Reservoir circulieren zu lassen, wurde eine peristaltische Pumpe benutzt ($0,135 \text{ ml} \times \text{min}^{-1}$). Das Ganze wurde im Wasserbad durchgeführt. Zu gewissen Intervallen wurden für die Analyse Proben entnommen. Das Enzym war noch nach 200 h aktiv. Mit 3 Biotransformationen (jede mit 4 g racemischem Substrat, wobei die erste bei 60 °C und die anderen zwei bei 40 °C durchgeführt wurden) konnten insgesamt 6 g (S)-Amid erhalten werden. Zu Beginn der Reaktion wurden immobilisiertes Enzym (spezifische Aktivität = $47 \mu\text{g} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg Protein}^{-1}$) bei 60 °C hinzugefügt, was vergleichbar ist (41 %) mit nicht immobilisiertem Enzym (spezifische Aktivität: $114 \mu\text{g} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg Protein}^{-1}$).

SEQUENZPROTOKOLL

(1) ALLGEMEINE ANGABEN:

(i) ANMELDER:

- (A) NAME: LONZA AG
- (B) STRASSE: Muenchensteinerstrasse 38
- (C) ORT: Basel
- (E) LAND: Schweiz
- (F) POSTLEITZAHL: 4002

- (ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: Verfahren zur Herstellung von (S)- oder (R)-3,3,3-trifluor-2-hydroxy-2-methylpropionsaeure

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 14

(iv) COMPUTER-LESBARE FASSUNG:

- (A) DATENTRÄGER: Floppy disk
- (B) COMPUTER: IBM PC compatible
- (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (EPA)

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 1442 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Doppelstrang
- (D) TOPOLOGIE: ringförmig

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

- (A) ORGANISMUS: Klebsiella oxytoca
- (B) STAMM: PRS1
- (C) INDIVIDUUM/ISOLAT: PRS1

(vii) UNMITTELBARE HERKUNFT:

- (B) CLON(E): pPRS2a

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
- (B) LAGE: join(197..1181)
- (D) SONSTIGE ANGABEN: /product= "Amidase"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

CCCGGGA	ACT	CCATGT	GGCC	GTGATC	CTGG	TCGAGC	AGGA	TATTGC	GATG	ATCCAG	CGGG	60		
CCGCAC	AGCG	CTGTGC	GGTA	ATGGAT	AAAG	GCCTGG	TTGT	AGAAAC	CGCTG	ACCCA	ACAAC	120		
AGCTCT	CTGA	TGATCT	TTTA	ATGCGT	CGTC	ATCTGG	GCTCT	GTAAC	TAAAC	GCTATA	AATT	180		
ACGTGG	GAGAA	TAACAT	ATG	AAA	TGG	TTG	GAA	GAA	TCC	ATT	ATG	GCC	AAA	229
		Met	Lys	Trp	Leu	Glu	Glu	Ser	Ile	Met	Ala	Lys		
		1				5						10		

CGC	GGT	GTT	GGT	GCC	GGG	CGT	AAA	CCG	GTA	ACG	CAT	CAC	CTG	ACG	GAA	277
Arg	Gly	Val	Gly	Ala	Gly	Arg	Lys	Pro	Val	Thr	His	His	Leu	Thr	Glu	
			15					20					25			
GAA	ATG	CAA	AAA	GAG	TTT	CAT	TAC	ACC	ATT	GGC	CCT	TAT	TCC	ACA	CCC	325
Glu	Met	Gln	Lys	Glu	Phe	His	Tyr	Thr	Ile	Gly	Pro	Tyr	Ser	Thr	Pro	
		30					35					40				
GTC	CTG	ACC	ATC	GAA	CCC	GGT	GAC	CGG	ATT	ATT	GTC	GAC	ACT	CGA	GAT	373
Val	Leu	Thr	Ile	Glu	Pro	Gly	Asp	Arg	Ile	Ile	Val	Asp	Thr	Arg	Asp	
	45					50					55					
GCT	TTT	GAA	GGT	GCT	ATC	AAT	TCG	GAA	CAG	GAT	ATT	CCG	AGC	CAG	TTG	421
Ala	Phe	Glu	Gly	Ala	Ile	Asn	Ser	Glu	Gln	Asp	Ile	Pro	Ser	Gln	Leu	
60					65					70					75	
CTA	AAA	ATG	CCC	TTT	CTC	AAC	CCA	CAA	AAC	GGA	CCG	ATC	ATG	GTC	AAT	469
Leu	Lys	Met	Pro	Phe	Leu	Asn	Pro	Gln	Asn	Gly	Pro	Ile	Met	Val	Asn	
				80					85					90		
GGC	GCG	GAG	AAA	GGT	GAT	GTG	CTC	GCT	GTC	TAT	ATC	GAA	TCC	ATG	TTG	517
Gly	Ala	Glu	Lys	Gly	Asp	Val	Leu	Ala	Val	Tyr	Ile	Glu	Ser	Met	Leu	
			95					100					105			
CCC	CGC	GGC	GTT	GAT	CCC	TAC	GGC	ATC	TGC	GCC	ATG	ATT	CCG	CAT	TTT	565
Pro	Arg	Gly	Val	Asp	Pro	Tyr	Gly	Ile	Cys	Ala	Met	Ile	Pro	His	Phe	
		110					115					120				
GGC	GGA	CTG	ACC	GGG	ACC	GAC	CTG	ACG	GCC	ATG	CTC	AAT	GAT	CCG	CTG	613
Gly	Gly	Leu	Thr	Gly	Thr	Asp	Leu	Thr	Ala	Met	Leu	Asn	Asp	Pro	Leu	
	125					130					135					
CCA	GAA	AAG	GTG	CGC	ATG	ATT	AAA	CTC	GAC	AGT	GAA	AAG	GTC	TAC	TGG	661
Pro	Glu	Lys	Val	Arg	Met	Ile	Lys	Leu	Asp	Ser	Glu	Lys	Val	Tyr	Trp	
140					145					150					155	
AGC	AAA	CGC	CAT	ACG	CTT	CCC	TAT	AAA	CCC	CAT	ATT	GGC	ACC	TTG	AGC	709
Ser	Lys	Arg	His	Thr	Leu	Pro	Tyr	Lys	Pro	His	Ile	Gly	Thr	Leu	Ser	
				160					165					170		
GTA	TCG	CCA	GAA	ATT	GAC	TCA	ATC	AAT	TCA	CTG	ACG	CCA	GAC	AAT	CAC	757
Val	Ser	Pro	Glu	Ile	Asp	Ser	Ile	Asn	Ser	Leu	Thr	Pro	Asp	Asn	His	
			175					180					185			
GGC	GGG	AAT	ATG	GAT	GTG	CCG	GAT	ATA	GGA	CCA	GGG	AGT	ATT	ACC	TAT	805
Gly	Gly	Asn	Met	Asp	Val	Pro	Asp	Ile	Gly	Pro	Gly	Ser	Ile	Thr	Tyr	
		190					195					200				
CTG	CCG	GTA	CGT	GCG	CCT	GGA	GGC	CGC	CTG	TTT	ATT	GGT	GAT	GCC	CAT	853
Leu	Pro	Val	Arg	Ala	Pro	Gly	Gly	Arg	Leu	Phe	Ile	Gly	Asp	Ala	His	
	205					210					215					
GCT	TGT	CAG	GGT	GAT	GGT	GAG	ATT	TGC	GGG	ACC	GCA	GTA	GAG	TTT	GCC	901
Ala	Cys	Gln	Gly	Asp	Gly	Glu	Ile	Cys	Gly	Thr	Ala	Val	Glu	Phe	Ala	
220					225					230					235	
TCA	ATC	ACC	ACC	ATC	AAA	GTC	GAT	TTG	ATC	AAG	AAC	TGG	CAG	CTT	TCC	949
Ser	Ile	Thr	Thr	Ile	Lys	Val	Asp	Leu	Ile	Lys	Asn	Trp	Gln	Leu	Ser	
				240					245					250		
TGG	CCA	CGA	ATG	GAG	AAT	GCC	GAA	AAT	ATT	ATG	AGT	ATT	GGC	AGT	GCA	997
Trp	Pro	Arg	Met	Glu	Asn	Ala	Glu	Asn	Ile	Met	Ser	Ile	Gly	Ser	Ala	
			255					260					265			

CGT CCG CTG GAG GAT GCG ACG CGA ATT GCA TAT CGC GAC TTA ATT TAC	1045
Arg Pro Leu Glu Asp Ala Thr Arg Ile Ala Tyr Arg Asp Leu Ile Tyr	
270 275 280	
TGG CTG GTA GAA GAC TTT GGC TTC GAA CAA TGG GAT GCC TAC ATG CTT	1093
Trp Leu Val Glu Asp Phe Gly Phe Glu Gln Trp Asp Ala Tyr Met Leu	
285 290 295	
CTG AGT CAA TGC GGC AAA GTG CGG CTG GGC AAC ATG GTC GAC CCC AAA	1141
Leu Ser Gln Cys Gly Lys Val Arg Leu Gly Asn Met Val Asp Pro Lys	
300 305 310 315	
TAC ACC GTT GGC GCG ATG CTG AAC AAA AAC CTG TTA GTT TAGTAGGAAT	1190
Tyr Thr Val Gly Ala Met Leu Asn Lys Asn Leu Leu Val	
320 325	
AACTAACCGG TGAACATTAC CCGGATGTAG ATCGGGGTAA TGTGTAAGTT CAAACAATCG	1250
CTATTTTAA CAGCTAAAGC AGGTGCATAT GGGGCCAGAT ACACCCATCA ATATTGGTTT	1310
ACTTTACTCC TTCAGCGGAG TGACGGCGGC ACAAGAGTTG TCACAATGGC GCGGAGCAAC	1370
CCAGGCTATT GCCGAAATTA ATCAAAATGG CGGCATCAAC GGCAGACCAC TCAATGCAAT	1430
TCATTGGAT CC	1442

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 2:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 328 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

Met Lys Trp Leu Glu Glu Ser Ile Met Ala Lys Arg Gly Val Gly Ala	
1 5 10 15	
Gly Arg Lys Pro Val Thr His His Leu Thr Glu Glu Met Gln Lys Glu	
20 25 30	
Phe His Tyr Thr Ile Gly Pro Tyr Ser Thr Pro Val Leu Thr Ile Glu	
35 40 45	
Pro Gly Asp Arg Ile Ile Val Asp Thr Arg Asp Ala Phe Glu Gly Ala	
50 55 60	
Ile Asn Ser Glu Gln Asp Ile Pro Ser Gln Leu Leu Lys Met Pro Phe	
65 70 75 80	
Leu Asn Pro Gln Asn Gly Pro Ile Met Val Asn Gly Ala Glu Lys Gly	
85 90 95	
Asp Val Leu Ala Val Tyr Ile Glu Ser Met Leu Pro Arg Gly Val Asp	
100 105 110	
Pro Tyr Gly Ile Cys Ala Met Ile Pro His Phe Gly Gly Leu Thr Gly	
115 120 125	
Thr Asp Leu Thr Ala Met Leu Asn Asp Pro Leu Pro Glu Lys Val Arg	
130 135 140	

Met Ile Lys Leu Asp Ser Glu Lys Val Tyr Trp Ser Lys Arg His Thr
 145 150 155 160
 Leu Pro Tyr Lys Pro His Ile Gly Thr Leu Ser Val Ser Pro Glu Ile
 165 170 175
 Asp Ser Ile Asn Ser Leu Thr Pro Asp Asn His Gly Gly Asn Met Asp
 180 185 190
 Val Pro Asp Ile Gly Pro Gly Ser Ile Thr Tyr Leu Pro Val Arg Ala
 195 200 205
 Pro Gly Gly Arg Leu Phe Ile Gly Asp Ala His Ala Cys Gln Gly Asp
 210 215 220
 Gly Glu Ile Cys Gly Thr Ala Val Glu Phe Ala Ser Ile Thr Thr Ile
 225 230 235 240
 Lys Val Asp Leu Ile Lys Asn Trp Gln Leu Ser Trp Pro Arg Met Glu
 245 250 255
 Asn Ala Glu Asn Ile Met Ser Ile Gly Ser Ala Arg Pro Leu Glu Asp
 260 265 270
 Ala Thr Arg Ile Ala Tyr Arg Asp Leu Ile Tyr Trp Leu Val Glu Asp
 275 280 285
 Phe Gly Phe Glu Gln Trp Asp Ala Tyr Met Leu Leu Ser Gln Cys Gly
 290 295 300
 Lys Val Arg Leu Gly Asn Met Val Asp Pro Lys Tyr Thr Val Gly Ala
 305 310 315 320
 Met Leu Asn Lys Asn Leu Leu Val
 325

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 3:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 20 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: nicht bekannt
- (D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

- (B) STAMM: PRS1
- (C) INDIVIDUUM/ISOLAT: PRS1

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:

Met Lys Trp Leu Glu Glu Ser Ile Met Ala Lys Arg Gly Val Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Arg Lys Pro
 20

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 4:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 5 Aminosäuren

- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: nicht bekannt
- (D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

- (B) STAMM: PRS1
- (C) INDIVIDUUM/ISOLAT: PRS1

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:

Val Tyr Trp Ser Lys
1 5

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 5:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 13 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: nicht bekannt
- (D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

- (B) STAMM: PRS1
- (C) INDIVIDUUM/ISOLAT: PRS1

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 5:

Lys Pro Val Thr His His Leu Thr Glu Glu Met Gln Lys
1 5 10

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 6:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 9 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: nicht bekannt
- (D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

- (B) STAMM: PRS1
- (C) INDIVIDUUM/ISOLAT: PRS1

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 6:

Tyr Thr Val Gly Ala Met Leu Asn Lys
1 5

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 7:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 14 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure

(C) STRANGFORM: nicht bekannt
(D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:
(B) STAMM: PRS1
(C) INDIVIDUUM/ISOLAT: PRS1

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 7:

Met Glu Asn Ala Glu Asn Ile Met Ser Ile Gly Ser Ala Arg
1 5 10

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 8:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 9 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: nicht bekannt
- (D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:
(B) STAMM: PRS1
(C) INDIVIDUUM/ISOLAT: PRS1

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEO ID NO: 8:

Trp Leu Glu Glu Ser Ile Met Ala Lys
1 5

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 9:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 (A) LÄNGE: 18 Aminosäuren
 (B) ART: Aminosäure
 (C) STRANFORM: nicht bekannt
 (D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:
(B) STAMM: PRS1
(C) INDIVIDUUM/ISOLAT: PRS1

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 9:

Met Pro Phe Leu Asn Pro Gln Asn Gly Pro Ile Met Val Asn Gly Ala
1 5 10 15

Glu Lys

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 10:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 19 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: nicht bekannt
- (D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

- (B) STAMM: PRS1
- (C) INDIVIDUUM/ISOLAT: PRS1

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 10:

Asp Ala Phe Glu Gly Ala Ile Asn Ser Glu Gln Asp Ile Pro Ser Gln
1 5 10 15

Leu Leu Lys

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 11:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 21 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: nicht bekannt
- (D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

- (B) STAMM: PRS1
- (C) INDIVIDUUM/ISOLAT: PRS1

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 11:

Glu Phe His Tyr Thr Ile Gly Pro Tyr Ser Thr Pro Val Leu Thr Ile
1 5 10 15

Glu Pro Gly Asp Arg
20

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 12:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 23 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: nicht bekannt
- (D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

- (B) STAMM: PRS1
- (C) INDIVIDUUM/ISOLAT: PRS1

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 12:

Leu Phe Ile Gly Asp Ala His Ala Glu Gln Gly Asp Gly Glu Ile Glu


```

1              5              10              15
Gly Thr Ala Val Glu Phe Ala
                20

```

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 13: "

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 14 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: nicht bekannt
- (D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:
(B) STAMM: PRS1
(C) INDIVIDUUM/ISOLAT: PRS1

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 13:

Gly Asp Val Leu Ala Val Tyr Ile Glu Ser Met Leu Pro Arg
1 5 10

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 14:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 33 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: nicht bekannt
- (D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:
(C) INDIVIDUUM/ISOLAT: PRS1

(vii) UNMITTELBARE HERKUNFT:
(B) CLON(E): PRS1

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 14:

Gly Val Asp Pro Tyr Gly Ile Glu Ala Met Ile Pro His Phe Gly Gly
1 5 10 15
Leu Thr Gly Thr Asp Leu Thr Ala Met Leu Asn Asp Gln Leu Gln Pro
20 25 30

Lys

BUDAPESTER VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE
ANERKENNUNG DER HINTERLEGUNG VON MIKROORGANISMEN
FÜR DIE ZWECKE VON PATENTVERFAHREN

INTERNATIONALES FORMBLATT

LONZA AG

CH-3930 Visp

EMPFANGSBESTÄTIGUNG BEI ERSTHINTERLEGUNG,
ausgestellt gemäß Regel 7.1 von der unten angegebenen
INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE

I. KENNZEICHNUNG DES MIKROORGANISMUS	
Vom HINTERLEGER zugeteiltes Bezugszeichen lpi 134	Von der INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE zugeteilte EINGANGSNUMMER DSM 11009
II. WISSENSCHAFTLICHE BESCHREIBUNG UND/ODER VORGESCHLAGENE TAXONOMISCHE BEZEICHNUNG	
<p>Mit dem unter I. bezeichneten Mikroorganismus wurde</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> eine wissenschaftliche Beschreibung</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> eine vorgeschlagene taxonomische Bezeichnung</p> <p>eingereicht (Zutreffendes ankreuzen).</p>	
III. EINGANG UND ANNAHME	
Diese internationale Hinterlegungsstelle nimmt den unter I bezeichneten Mikroorganismus an, der bei ihr am 1996-06-24 (Datum der Ersthinterlegung) eingegangen ist	
IV. EINGANG DES ANTRAGS AUF UMWANDLUNG	
Der unter I bezeichnete Mikroorganismus ist bei dieser internationalen Hinterlegungsstelle am eingegangen (Datum der Ersthinterlegung) und ein Antrag auf Umwandlung dieser Ersthinterlegung in eine Hinterlegung gemäß Budapest Vertrag ist am eingegangen (Datum des Eingangs des Antrags auf Umwandlung)	
V. INTERNATIONALE HINTERLEGUNGSSTELLE	
<p>Name: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH</p> <p>Anschrift: Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig</p>	<p>Unterschrift(en) der zur Vertretung der internationalen Hinterlegungsstelle befugten Person(en) oder des (der) von ihr ermächtigten Bediensteten:</p> <p><i>C. W. W.</i></p> <p>Datum: 1996-06-26</p>

BUDAPESTER VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE
ANERKENNUNG DER HINTERLEGUNG VON MIKROORGANISMEN
FÜR DIE ZWECKE VON PATENTVERFAHREN

INTERNATIONALES FORMBLATT

LONZA AG

CH-3930 Visp

LEBENSFÄHIGKEITSBESCHEINIGUNG

ausgestellt gemäß Regel 10.2 von der unten angegebenen
INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE

I. HINTERLEGER Name: LONZA AG Anschrift: CH-3930 Visp	II. KENNZEICHNUNG DES MIKROORGANISMUS Von der INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE zugeteilte EINGANGSNUMMER: DSM 11009 Datum der Hinterlegung oder Weiterleitung ¹ : 1996-06-24		
III. LEBENSFÄHIGKEITSBESCHEINIGUNG Die Lebensfähigkeit des unter II genannten Mikroorganismus ist am 1996-06-24 ² geprüft worden. Zu diesem Zeitpunkt war der Mikroorganismus <input checked="" type="checkbox"/> ³ lebensfähig <input type="checkbox"/> ³ nicht mehr lebensfähig			
IV. BEDINGUNGEN, UNTER DENEN DIE LEBENSFÄHIGKEITSPRÜFUNG DURCHFÜHRT WORDEN IST⁴ <div style="height: 40px;"></div>			
V. INTERNATIONALE HINTERLEGUNGSSTELLE¹ <table style="width: 100%;"> <tr> <td style="width: 50%; vertical-align: top;"> Name: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH Anschrift: Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig </td> <td style="width: 50%; vertical-align: top;"> Unterschriften) der zur Vertretung der internationalen Hinterlegungsstelle befugten Person(en) oder des (der) von ihr ermächtigten Bediensteten <div style="text-align: center;"><i>J. Wals</i></div> Datum: 1996-06-26 </td> </tr> </table>		Name: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH Anschrift: Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig	Unterschriften) der zur Vertretung der internationalen Hinterlegungsstelle befugten Person(en) oder des (der) von ihr ermächtigten Bediensteten <div style="text-align: center;"><i>J. Wals</i></div> Datum: 1996-06-26
Name: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH Anschrift: Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig	Unterschriften) der zur Vertretung der internationalen Hinterlegungsstelle befugten Person(en) oder des (der) von ihr ermächtigten Bediensteten <div style="text-align: center;"><i>J. Wals</i></div> Datum: 1996-06-26		

- ¹ Angabe des Datums der Ersthinterlegung. Wenn eine erneute Hinterlegung oder eine Weiterleitung vorgenommen worden ist, Angabe des Datums der jeweils letzten erneuten Hinterlegung oder Weiterleitung
- ² In den in Regel 10.2 Buchstabe a Ziffer ii und iii vorgesehenen Fällen Angabe der letzten Lebensfähigkeitsprüfung
- ³ Zutreffendes ankreuzen.
- ⁴ Ausfüllen, wenn die Angaben beantragt worden sind und wenn die Ergebnisse der Prüfung negativ waren.


BUDAPESTER VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE
ANERKENNUNG DER HINTERLEGUNG VON MIKROORGANISMEN
FÜR DIE ZWECKE VON PATENTVERFAHREN

INTERNATIONALES FORMBLATT

LONZA AG

CH-3930 Visp

EMPFANGSBESTÄTIGUNG BEI ERSTHINTERLEGUNG,
ausgestellt gemäß Regel 7.1 von der unten angegebenen
INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE.

I. KENNZEICHNUNG DES MIKROORGANISMUS	
Vom HINTERLEGER zugeteiltes Bezugszeichen: 4pl 11	Von der INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE zugeteilte EINGANGSNUMMER: DSM 11010
II. WISSENSCHAFTLICHE BESCHREIBUNG UND/ODER VORGESCHLAGENE TAXONOMISCHE BEZEICHNUNG	
<p>Mit dem unter I. bezeichneten Mikroorganismus wurde</p> <p><input type="checkbox"/> eine wissenschaftliche Beschreibung</p> <p><input type="checkbox"/> eine vorgeschlagene taxonomische Bezeichnung</p> <p>eingereicht. (Zutreffendes ankreuzen).</p>	
III. EINGANG UND ANNAHME	
Diese internationale Hinterlegungsstelle nimmt den unter I bezeichneten Mikroorganismus an, der bei ihr am 1996-06-24 (Datum der Ersthinterlegung) ¹ eingegangen ist.	
IV. EINGANG DES ANTRAGS AUF UMWANDLUNG	
Der unter I bezeichnete Mikroorganismus ist bei dieser internationalen Hinterlegungsstelle am eingegangen (Datum der Ersthinterlegung) und ein Antrag auf Umwandlung dieser Ersthinterlegung in eine Hinterlegung gemäß Budapest Vertrag ist am eingegangen (Datum des Eingangs des Antrags auf Umwandlung).	
V. INTERNATIONALE HINTERLEGUNGSSTELLE	
<p>Name: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH</p> <p>Anschrift: Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig</p>	<p>Unterschrift(en) der zur Vertretung der internationalen Hinterlegungsstelle befugten Person(en) oder des (der) von ihr ermächtigten Bediensteten:</p> <p></p> <p>Datum: 1996-06-26</p>

¹ Falls Regel 6.4 Buchstabe d zutrifft, ist dies der Zeitpunkt, zu dem der Status einer internationalen Hinterlegungsstelle erworben worden ist.


BUDAPESTER VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE
ANERKENNUNG DER HINTERLEGUNG VON MIKROORGANISMEN
FÜR DIE ZWECKE VON PATENTVERFAHREN

INTERNATIONALES FORMBLATT

LONZA AG

CH-3930 Visp

LEBENSFÄHIGKEITSBESCHEINIGUNG
ausgestellt gemäß Regel 10.2 von der unten angegebenen
INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE

I. HINTERLEGER	II. KENNZEICHNUNG DES MIKROORGANISMUS
Name: LONZA AG Anschrift: CH-3930 Visp	Von der INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE zugeteilte EINGANGSNUMMER: DSM 11010 Datum der Hinterlegung oder Weiterleitung: 1996-06-24
III. LEBENSFÄHIGKEITSBESCHEINIGUNG	
Die Lebensfähigkeit des unter II genannten Mikroorganismus ist am 1996-06-24 geprüft worden. Zu diesem Zeitpunkt war der Mikroorganismus <input checked="" type="checkbox"/> (X) lebensfähig <input type="checkbox"/> () nicht mehr lebensfähig	
IV. BEDINGUNGEN, UNTER DENEN DIE LEBENSFÄHIGKEITSPRÜFUNG DURCHFÜHRT WORDEN IST	
V. INTERNATIONALE HINTERLEGUNGSSTELLE	
Name: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH Anschrift: Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig	Unterschrift(en) der zur Vertretung der internationalen Hinterlegungsstelle befugten Person(en) oder des (der) von ihr ermächtigten Bediensteten:  Datum: 1996-06-26

Angabe des Datums der Ersthinterlegung. Wenn eine erneute Hinterlegung oder eine Weiterleitung vorgenommen worden ist, Angabe des Datums der jeweils letzten erneuten Hinterlegung oder Weiterleitung.

In den in Regel 10.2 Buchstabe a Ziffer ii und iii vorgesehenen Fällen Angabe der letzten Lebensfähigkeitsprüfung.
Zutreffendes ankreuzen.

Ausfüllen, wenn die Angaben beantragt worden sind und wenn die Ergebnisse der Prüfung negativ waren.

BUDAPESTER VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE
ANERKENNUNG DER HINTERLEGUNG VON MIKROORGANISMEN
FÜR DIE ZWECKE VON PATENTVERFAHREN

INTERNATIONALES FORMBLATT

Lonza AG
Lonzastrasse
CH-3930 Visp

EMPFANGSBESTÄTIGUNG BEI ERSTHINTERLEGUNG,
ausgestellt gemäß Regel 7.1 von der unten angegebenen
INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE

I. KENNZEICHNUNG DES MIKROORGANISMUS	
Vom HINTERLEGER zugeteiltes Bezugszeichen: ID-622 (Lonza PRS14)	Von der INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE zugeteilte EINGANGSNUMMER: DSM 11344
II. WISSENSCHAFTLICHE BESCHREIBUNG UND/ODER VORGESCHLAGENE TAXONOMISCHE BEZEICHNUNG	
<p>Mit dem unter I. bezeichneten Mikroorganismus wurde</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> eine wissenschaftliche Beschreibung</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> eine vorgeschlagene taxonomische Bezeichnung</p> <p>eingereicht. (Zutreffendes ankreuzen).</p>	
III. EINGANG UND ANNAHME	
Diese internationale Hinterlegungsstelle nimmt den unter I bezeichneten Mikroorganismus an, der bei ihr am 1996-12-13 (Datum der Ersthinterlegung) eingegangen ist.	
IV. EINGANG DES ANTRAGS AUF UMWANDLUNG	
Der unter I bezeichnete Mikroorganismus ist bei dieser Internationalen Hinterlegungsstelle am eingegangen (Datum der Ersthinterlegung) und ein Antrag auf Umwandlung dieser Ersthinterlegung in eine Hinterlegung gemäß Budapest Vertrag ist am eingegangen (Datum des Eingangs des Antrags auf Umwandlung).	
V. INTERNATIONALE HINTERLEGUNGSSTELLE	
<p>Name: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH</p> <p>Anschrift: Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig</p>	<p>Unterschrift(en) der zur Vertretung der internationalen Hinterlegungsstelle befugten Person(en) oder des (der) von ihr ermächtigten Bediensteten:</p> <p><i>V. Weh</i></p> <p>Datum: 1997-01-09</p>


* Falls Regel 6.4 Buchstabe d zutrifft, ist dies der Zeitpunkt, zu dem der Status einer internationalen Hinterlegungsstelle erworben worden ist.

BIESTER VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE
ANERKENNUNG DER HINTERLEGUNG VON MIKROORGANISMEN
FÜR DIE ZWECKE VON PATENT/ERFAHREN

INTERNATIONALES FORMBLATT

Lonza AG
Lonzastrasse
CH-3930 Visp

LEBENSFÄHIGKEITSBESCHEINIGUNG
ausgestellt gemäß Regel 10.2 von der unten angegebenen
INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE

I. HINTERLEGER	II. KENNZEICHNUNG DES MIKROORGANISMUS
Name: Lonza AG Lonzastrasse Anschrift: CH-3930 Visp	Von der INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE zugeteilte EINGANGSNUMMER: DSM 11344 Datum der Hinterlegung oder Weiterleitung: 1996-12-13
III. LEBENSFÄHIGKEITSBESCHEINIGUNG	
Die Lebensfähigkeit des unter II genannten Mikroorganismus ist am 1996-12-17 ¹ geprüft worden. Zu diesem Zeitpunkt war der Mikroorganismus <input checked="" type="checkbox"/> lebensfähig <input type="checkbox"/> nicht mehr lebensfähig	
IV. BEDINGUNGEN, UNTER DENEN DIE LEBENSFÄHIGKEITSPRÜFUNG DURCHGEFÜHRT WORDEN IST ²	
V. INTERNATIONALE HINTERLEGUNGSSTELLE	
Name: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH Anschrift: Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig	Unterschrift(en) der zur Vertretung der internationalen Hinterlegungsstelle befugten Person(en) oder des (der) von ihr ermächtigten Bediensteten:  Datum: 1997-01-09

¹ Angabe des Datums der Ersthinterlegung. Wenn eine erneute Hinterlegung oder eine Weiterleitung vorgenommen worden ist, Angabe des Datums der jeweils letzten erneuten Hinterlegung oder Weiterleitung.

² In den in Regel 10.2 Buchstabe a Ziffer ii und iii vorgesehenen Fällen Angabe der letzten Lebensfähigkeitsprüfung.
³ Zutreffendes ankreuzen.

⁴ Ausfüllen, wenn die Angaben beantragt worden sind und wenn die Ergebnisse der Prüfung negativ waren.

BUDAPESTER VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE
ANERKENNUNG DER HINTERLEGUNG VON MIKROORGANISMEN
FÜR DIE ZWECKE VON PATENTVERFAHREN

INTERNATIONALES FORMBLATT

Lonza AG
Lonzastrasse
CH-3930 Visp

EMPFANGSBESTÄTIGUNG BEI ERSTHINTERLEGUNG,
ausgestellt gemäß Regel 7.1 von der unten angegebenen
INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE

I. KENNZEICHNUNG DES MIKROORGANISMUS	
Vom HINTERLEGER zugeteiltes Bezugszeichen: D-620 (Lonza PRS11)	Von der INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE zugeteilte EINGANGSNUMMER: DSM 11350
II. WISSENSCHAFTLICHE BESCHREIBUNG UND/ODER VORGESCHLAGENE TAXONOMISCHE BEZEICHNUNG	
<p>Mit dem unter I. bezeichneten Mikroorganismus wurde</p> <p>(X) eine wissenschaftliche Beschreibung (X) eine vorgeschlagene taxonomische Bezeichnung</p> <p>eingereicht. (Zutreffendes ankreuzen).</p>	
III. EINGANG UND ANNAHME	
Diese internationale Hinterlegungsstelle nimmt den unter I bezeichneten Mikroorganismus an, der bei ihr am 1996-12-13 (Datum der Ersthinterlegung) eingegangen ist.	
IV. EINGANG DES ANTRAGS AUF UMWANDLUNG	
Der unter I bezeichnete Mikroorganismus ist bei dieser Internationalen Hinterlegungsstelle am eingegangen (Datum der Ersthinterlegung) und ein Antrag auf Umwandlung dieser Ersthinterlegung in eine Hinterlegung gemäß Budapest Vertrag ist am eingegangen (Datum des Eingangs des Antrags auf Umwandlung).	
V. INTERNATIONALE HINTERLEGUNGSSTELLE	
<p>Name: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH</p> <p>Anschrift: Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig</p>	<p>Unterschrift(en) der zur Vertretung der internationalen Hinterlegungsstelle befugten Person(en) oder des (der) von ihr ermächtigten Bediensteten:</p> <p><i>V. Wachs</i></p> <p>Datum: 1997-01-09</p>

¹ Falls Regel 6.4 Buchstabe d zutrifft, ist dies der Zeitpunkt, zu dem der Status einer internationalen Hinterlegungsstelle erworben worden ist.

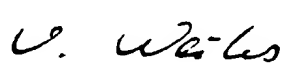
ANEL. DAPESTER VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE
ANNUUNG DER HINTERLEGUNG VON MIKROORGANISMEN
FÜR DIE ZWECKE VON PATENTVERFAHREN

INTERNATIONALES FORMBLATT

Lonza AG
Lonzastrasse

CH-3930 Visp

LEBENSFAHIGKEITSBESCHEINIGUNG
ausgestellt gemäß Regel 10.2 von der unten angegebenen
INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE

I. HINTERLEGER	II. KENNZEICHNUNG DES MIKROORGANISMUS
Name: Lonza AG Lonzastrasse Anschrift: CH-3930 Visp	Von der INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE zugeteilte EINGANGSNUMMER: DSM 11350 Datum der Hinterlegung oder Weiterleitung: 1996-12-13
III. LEBENSFAHIGKEITSBESCHEINIGUNG	
Die Lebensfähigkeit des unter II genannten Mikroorganismus ist am 1996-12-13 ¹ geprüft worden. Zu diesem Zeitpunkt war der Mikroorganismus <input checked="" type="checkbox"/> ² lebensfähig <input type="checkbox"/> ² nicht mehr lebensfähig	
IV. BEDINGUNGEN, UNTER DENEN DIE LEBENSFAHIGKEITSPRÜFUNG DURCHGEFÜHRT WORDEN IST ¹	
V. INTERNATIONALE HINTERLEGUNGSSTELLE	
Name: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH Anschrift: Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig	Unterschrift(en) der zur Vertretung der internationalen Hinterlegungsstelle befugten Person(en) oder des (der) von ihr ermächtigten Bediensteten:  Datum: 1997-01-09


¹ Angabe des Datums der Ersthinterlegung. Wenn eine erneute Hinterlegung oder eine Weiterleitung vorgenommen worden ist, Angabe des Datums
 der jeweils letzten erneuten Hinterlegung oder Weiterleitung.
 In den in Regel 10.2 Buchstabe a Ziffer ii und iii vorgesehenen Fällen Angabe der letzten Lebensfähigkeitsprüfung.
 Zutreffendes ankreuzen.
² Ausfüllen, wenn die Angaben beantragt worden sind und wenn die Ergebnisse der Prüfung negativ waren.

BUDAPESTER VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE
ANERKENNUNG DER HINTERLEGUNG VON MIKROORGANISMEN
FÜR DIE ZWECKE VON PATENTVERFAHREN

INTERNATIONALES FORMBLATT

Lonza AG
Lonzastrasse
CH-3930 Visp

EMPFANGSBESTÄTIGUNG BEI ERSTHINTERLEGUNG,
ausgestellt gemäß Regel 7.1 von der unten angegebenen
INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE

I. KENNZEICHNUNG DES MIKROORGANISMUS	
Vom HINTERLEGER zugeteiltes Bezugszeichen: ID-621 (Lonza PRS12)	Von der INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE zugeteilte EINGANGSNUMMER: DSM 11351
II. WISSENSCHAFTLICHE BESCHREIBUNG UND/ODER VORGESCHLAGENE TAXONOMISCHE BEZEICHNUNG	
Mit dem unter I. bezeichneten Mikroorganismus wurde <input checked="" type="checkbox"/> eine wissenschaftliche Beschreibung <input checked="" type="checkbox"/> eine vorgeschlagene taxonomische Bezeichnung eingereicht. (Zutreffendes ankreuzen).	
III. EINGANG UND ANNAHME	
Diese internationale Hinterlegungsstelle nimmt den unter I bezeichneten Mikroorganismus an, der bei ihr am 1996-12-13 (Datum der Ersthinterlegung) ¹ eingegangen ist.	
IV. EINGANG DES ANTRAGS AUF UMWANDLUNG	
Der unter I bezeichnete Mikroorganismus ist bei dieser Internationalen Hinterlegungsstelle am eingegangen (Datum der Erst- hinterlegung) und ein Antrag auf Umwandlung dieser Ersthinterlegung in eine Hinterlegung gemäß Budapest Vertrag ist am eingegangen (Datum des Eingangs des Antrags auf Umwandlung).	
V. INTERNATIONALE HINTERLEGUNGSSTELLE	
Name: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH Anschrift: Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig	Unterschrift(en) der zur Vertretung der internationalen Hinterlegungsstelle befugten Person(en) oder des (der) von ihr ermächtigten Bediensteten:  Datum: 1997-01-09

¹ Falls Regel 6.4 Buchstabe d zutrifft, ist dies der Zeitpunkt, zu dem der Status einer internationalen Hinterlegungsstelle erworben worden ist.

APESTER VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE
ANERKENNUNG DER HINTERLEGUNG VON MIKROORGANISMEN
FÜR DIE ZWECKE VON PATENTVERFAHREN


INTERNATIONALES FORMBLATT

Lonza AG
Lonzastrasse

CH-3930 Visp

LEBENSFÄHIGKEITSBESCHEINIGUNG

ausgestellt gemäß Regel 10.2 von der unten angegebenen
INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE

I. HINTERLEGER	II. KENNZEICHNUNG DES MIKROORGANISMUS
Name: Lonza AG Lonzastrasse Anschrift: CH-3930 Visp	Von der INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE zugeteilte EINGANGSNUMMER: DSM 11351 Datum der Hinterlegung oder Weiterleitung: 1996-12-13
III. LEBENSFÄHIGKEITSBESCHEINIGUNG	
Die Lebensfähigkeit des unter II genannten Mikroorganismus ist am 1996-12-16 ¹ geprüft worden. Zu diesem Zeitpunkt war der Mikroorganismus <input checked="" type="checkbox"/> lebensfähig <input type="checkbox"/> nicht mehr lebensfähig	
IV. BEDINGUNGEN, UNTER DENEN DIE LEBENSFÄHIGKEITSPRÜFUNG DURCHGEFÜHRT WORDEN IST ²	
V. INTERNATIONALE HINTERLEGUNGSSTELLE	
Name: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH Anschrift: Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig	Unterschrift(en) der zur Vertretung der internationalen Hinterlegungsstelle befugten Person(en) oder des (der) von ihr ermächtigten Bediensteten:  Datum: 1997-01-09

¹ Angabe des Datums der Ersthinterlegung. Wenn eine erneute Hinterlegung oder eine Weiterleitung vorgenommen worden ist, Angabe des Datums der jeweils letzten erneuten Hinterlegung oder Weiterleitung.

² In den in Regel 10.2 Buchstabe a Ziffer ii und iii vorgesehenen Fällen Angabe der letzten Lebensfähigkeitsprüfung.

³ Zutreffendes ankreuzen.

⁴ Ausfüllen, wenn die Angaben beantragt worden sind und wenn die Ergebnisse der Prüfung negativ waren.

DAPESTER VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE
ANNEKUNG DER HINTERLEGUNG VON MIKROORGANISMEN
FÜR DIE ZWECKE VON PATENTVERFAHREN

INTERNATIONALES FORMBLATT

Lonza
Lonzastrasse
CH-3930 Visp

EMPFANGSBESTÄTIGUNG BEI ERSTHINTERLEGUNG,
ausgestellt gemäß Regel 7.1 von der unten angegebenen
INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE

I. KENNZEICHNUNG DES MIKROORGANISMUS	
Vom HINTERLEGER zugewiesenes Bezugszeichen: D-624 (Lonza PRS16)	Von der INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE zugewiesene EINGANGSNUMMER: DSM 11354
II. WISSENSCHAFTLICHE BESCHREIBUNG UND/ODER VORGESCHLAGENE TAXONOMISCHE BEZEICHNUNG	
<p>Mit dem unter I. bezeichneten Mikroorganismus wurde</p> <p>(X) eine wissenschaftliche Beschreibung</p> <p>(X) eine vorgeschlagene taxonomische Bezeichnung</p> <p>eingereicht. (Zutreffendes ankreuzen).</p>	
III. EINGANG UND ANNAHME	
Diese internationale Hinterlegungsstelle nimmt den unter I bezeichneten Mikroorganismus an, der bei ihr am 1996-12-27 (Datum der Ersthinterlegung) eingegangen ist.	
IV. EINGANG DES ANTRAGS AUF UMWANDLUNG	
Der unter I bezeichnete Mikroorganismus ist bei dieser Internationalen Hinterlegungsstelle am eingegangen (Datum der Ersthinterlegung) und ein Antrag auf Umwandlung dieser Ersthinterlegung in eine Hinterlegung gemäß Budapest Vertrag ist am eingegangen (Datum des Eingangs des Antrags auf Umwandlung).	
V. INTERNATIONALE HINTERLEGUNGSSTELLE	
<p>Name: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH</p> <p>Anschrift: Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig</p>	<p>Unterschrift(en) der zur Vertretung der internationalen Hinterlegungsstelle befugten Person(en) oder des (der) von ihr ermächtigten Bediensteten:</p> <p><i>V. Wachs</i></p> <p>Datum: 1997-01-09</p>

¹ Falls Regel 6.4 Buchstabe d zutrifft, ist dies der Zeitpunkt, zu dem der Status einer internationalen Hinterlegungsstelle erworben worden ist.


HAPOSTER VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE
ANERKENNUNG DER HINTERLEGUNG VON MIKROORGANISMEN
FÜR DIE ZWECKE VON PATENTVERFAHREN

INTERNATIONALES FORMBLATT

Lonza
Lonzastrasse

CH-3930 Visp

LEBENSFÄHIGKEITSBESCHEINIGUNG
ausgestellt gemäß Regel 10.2 von der unten angegebenen
INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE

I. HINTERLEGER	II. KENNZEICHNUNG DES MIKROORGANISMUS
Name: Lonza Lonzastrasse Anschrift: CH-3930 Visp	Von der INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE zugeteilte EINGANGSNUMMER: DSM 11354 Datum der Hinterlegung oder Weiterleitung: 1996-12-27
III. LEBENSFÄHIGKEITSBESCHEINIGUNG	
Die Lebensfähigkeit des unter II genannten Mikroorganismus ist am 1997-01-06 geprüft worden. Zu diesem Zeitpunkt war der Mikroorganismus <input checked="" type="checkbox"/> lebensfähig <input type="checkbox"/> nicht mehr lebensfähig	
IV. BEDINGUNGEN, UNTER DENEN DIE LEBENSFÄHIGKEITSPRÜFUNG DURCHGEFÜHRT WORDEN IST	
V. INTERNATIONALE HINTERLEGUNGSSTELLE	
Name: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH Anschrift: Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig	Unterschrift(en) der zur Vertretung der internationalen Hinterlegungsstelle befugten Person(en) oder des (der) von ihr ermächtigten Bediensteten:  Datum: 1997-01-09

Angabe des Datums der Ersthinterlegung. Wenn eine erneute Hinterlegung oder eine Weiterleitung vorgenommen worden ist, Angabe des Datums der jeweils letzten erneuten Hinterlegung oder Weiterleitung.

In den in Regel 10.2 Buchstabe a Ziffer ii und iii vorgesehenen Fällen Angabe der letzten Lebensfähigkeitsprüfung.

Zutreffendes ankreuzen.


Ausfüllen, wenn die Angaben beantragt worden sind und wenn die Ergebnisse der Prüfung negativ waren.

DAPESTER VERTRAG UBER DIE INTERNATIONALE
ANERKENNUNG DER HINTERLEGUNG VON MIKROORGANISMEN
FUR DIE ZWECHE VON PATENTVERFAHREN

INTERNATIONALES FORMBLATT

Lonza
Lonzastrasse
CH-3930 Visp

EMPFANGSBESTÄTIGUNG BEI ERSTHINTERLEGUNG,
ausgestellt gemäß Regel 7.1 von der unten angegebenen
INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE

I. KENNZEICHNUNG DES MIKROORGANISMUS	
Vom HINTERLEGER zugeteiltes Bezugszeichen: ID-625 (Lonza PRS17)	Von der INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE zugeteilte EINGANGSNUMMER: DSM 11355
II. WISSENSCHAFTLICHE BESCHREIBUNG UND/ODER VORGESCHLAGENE TAXONOMISCHE BEZEICHNUNG	
Mit dem unter I. bezeichneten Mikroorganismus wurde <input checked="" type="checkbox"/> (X) eine wissenschaftliche Beschreibung <input checked="" type="checkbox"/> (X) eine vorgeschlagene taxonomische Bezeichnung eingereicht. (Zutreffendes ankreuzen).	
III. EINGANG UND ANNAHME	
Diese internationale Hinterlegungsstelle nimmt den unter I bezeichneten Mikroorganismus an, der bei ihr am 1996-12-27 (Datum der Ersthinterlegung) ¹ eingegangen ist.	
IV. EINGANG DES ANTRAGS AUF UMWANDLUNG	
Der unter I bezeichnete Mikroorganismus ist bei dieser internationalen Hinterlegungsstelle am eingegangen (Datum der Ersthinterlegung) und ein Antrag auf Umwandlung dieser Ersthinterlegung in eine Hinterlegung gemäß Budapester Vertrag ist am eingegangen (Datum des Eingangs des Antrags auf Umwandlung).	
V. INTERNATIONALE HINTERLEGUNGSSTELLE	
Name: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH Anschrift: Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig	Unterschrift(en) der zur Vertretung der internationalen Hinterlegungsstelle befugten Person(en) oder des (der) von ihr ermächtigten Bediensteten:  Datum: 1997-01-09


¹ Falls Regel 6.4 Buchstabe d zutrifft, ist dies der Zeitpunkt, zu dem der Status einer internationalen Hinterlegungsstelle erworben worden ist.
Formblatt DSMZ-BP/4 (einzige Seite) 0196

HAPOSTER VERTRAG UBER DIE INTERNATIONALE
ANERKENNUNG DER HINTERLEGUNG VON MIKROORGANISMEN
FÜR DIE ZWECKE VON PATENTVERFAHREN

INTERNATIONALES FORMBLATT

Lonza
Lonzastrasse
CH-3930 Visp

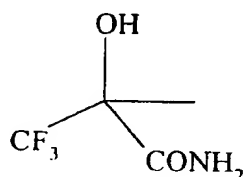
LEBENSFÄHIGKEITSBESCHEINIGUNG
ausgestellt gemäß Regel 10.2 von der unten angegebenen
INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE

I. HINTERLEGER	II. KENNZEICHNUNG DES MIKROORGANISMUS
Name: Lonza Lonzastrasse Anschrift: CH-3930 Visp	Von der INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE zugeteilte EINGANGSNUMMER: DSM 11355 Datum der Hinterlegung oder Weiterleitung: 1996-12-27
III. LEBENSFÄHIGKEITSBESCHEINIGUNG	
Die Lebensfähigkeit des unter II genannten Mikroorganismus ist am 1997-01-06 ² geprüft worden. Zu diesem Zeitpunkt war der Mikroorganismus (X) ¹ lebensfähig () ¹ nicht mehr lebensfähig	
IV. BEDINGUNGEN, UNTER DENEN DIE LEBENSFÄHIGKEITSPRÜFUNG DURCHGEFÜHRT WORDEN IST ¹	
V. INTERNATIONALE HINTERLEGUNGSSTELLE	
Name: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH Anschrift: Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig	Unterschrift(en) der zur Vertretung der internationalen Hinterlegungsstelle befugten Person(en) oder des (der) von ihr ermächtigten Bediensteten:  Datum: 1997-01-09

¹ Angabe des Datums der Ershinterlegung. Wenn eine erneute Hinterlegung oder eine Weiterleitung vorgenommen worden ist, Angabe des Datums
 der jeweils letzten erneuten Hinterlegung oder Weiterleitung.
² In den in Regel 10.2 Buchstabe a Ziffer ii und iii vorgesehenen Fällen Angabe der letzten Lebensfähigkeitsprüfung.
³ Zutreffendes ankreuzen.
⁴ Ausfüllen, wenn die Angaben beantragt worden sind und wenn die Ergebnisse der Prüfung negativ waren.

Patentansprüche

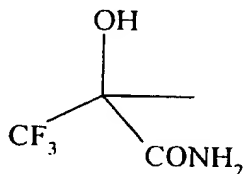
1. Mikroorganismen, dadurch gekennzeichnet, dass sie befähigt sind, das Propionsäureamid der Formel



VI

in Form des Racemats oder seiner optisch aktiven Isomere als einzige Stickstoffquelle zu verwerten sowie Enzymextrakte daraus.

2. Mikroorganismen nach Anspruch 1 der Gattung *Rhodococcus*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Klebsiella* oder *Pseudomonas*.
3. Mikroorganismen nach Anspruch 2 der Spezies *Klebsiella oxytoca* PRS1 (DSM 11009), *Klebsiella oxytoca* PRS1K17 (DSM 11623), *Rhodococcus opacus* ID-622 (DSM 11344), *Arthrobacter ramosus* ID-620 (DSM 11350), *Bacillus* sp. ID-621 (DSM 11351), *Klebsiella planticola* ID-624 (DSM 11354), *Klebsiella pneumoniae* ID-625 (DSM 11355) oder der Spezies *Pseudomonas* sp. (DSM 11010) oder deren funktionell äquivalente Varianten und Mutanten.
4. Polypeptid mit Amidohydrolase-Aktivität und befähigt, (R)-3,3,3-Trifluor-2-hydroxy-2-methylpropionsäureamid der Formel



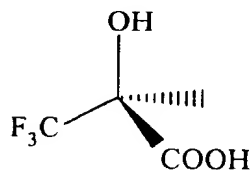
VI

zu hydrolysieren.

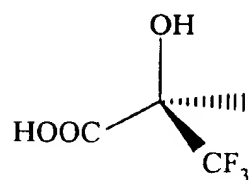
5. Polypeptid nach Anspruch 4, worin das Polypeptid die in SEQ ID No. 2 dargestellte Aminosäuresequenz oder ein Fragment davon oder ein funktionell äquivalentes Derivate dieser Sequenz oder dieses Sequenzfragments mit Aminosäuredeletionen, -substitutionen, -insertionen, -inversionen, -additionen und/oder -austauschen umfaßt.

6. DNA-Sequenz, codierend für ein Polypeptid nach einem der Ansprüche 4 oder 5.
7. DNA-Sequenz für die Expression eines Polypeptids nach einem der Ansprüche 4 oder 5 in einem Wirt, umfassend eine DNA-Sequenz ausgewählt aus
 - (a) DNA mit der in SEQ ID No. 1 dargestellten Sequenz, Fragmenten davon und komplementären Sequenzen hierzu, sowie von diesen abgeleiteten Sequenzen, die in den codierenden Regionen aufgrund der Variation des genetischen Codes degeneriert sind; und
 - (b) DNA-Sequenzen, die mit den codierenden Regionen der unter (a) definierten Sequenzen hybridisieren, oder Fragmente davon.
8. DNA-Sequenz nach Anspruch 6 oder 7, charakterisiert durch die Restriktionskarte gemäss Fig. 1 oder funktionell äquivalente genetische Varianten und Mutanten davon.
9. Rekombinantes DNA-Molekül oder Vektor, enthaltend eine DNA-Sequenz nach irgendeinem der Ansprüche 6 bis 8.
10. Rekombinantes DNA-Molekül nach Anspruch 9, nämlich Plasmid pPRS1b, pPRS7, pPRS4 oder Plasmid pPRS2a.
11. Mikroorganismen, enthaltend ein rekombinantes DNA-Molekül oder einen Vektor nach irgendeinem der Ansprüche 9 oder 10.
12. Mikroorganismen nach Anspruch 11, ausgewählt aus Mikroorganismen der Gattung Escherichia, Pseudomonas, Comamonas, Acinetobacter, Rhizobium / Agrobacterium, Rhizobium, Bacillus, Rhodococcus oder Agrobacterium.
13. Mikroorganismus Escherichia coli DH5, enthaltend Plasmid pPRS1b, pPRS2a, pPRS4 oder Plasmid pPRS7.
14. Mikroorganismus Escherichia coli XL1-Blue MRF'[®], enthaltend Plasmid pPRS1b,, pPRS2a, pPRS4 oder Plasmid pPRS7.

15. Verfahren zur Herstellung von (S)- oder (R)-3,3,3-Trifluor-2-hydroxy-2-methylpropionsäure der Formeln

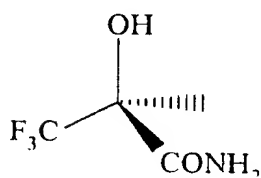


I

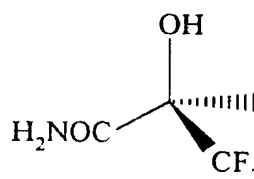


II

und / oder von (R)- oder (S)-3,3,3-trifluor-2-hydroxy-2-methylpropionsäureamid der Formeln

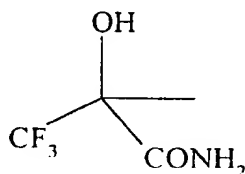


VII



VIII

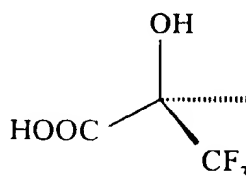
umfassend die Umsetzung des Propionsäureamids der Formel



VI

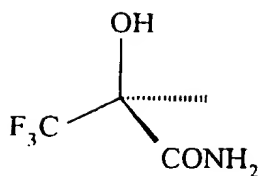
mittels eines Mikroorganismus gemäss den Ansprüchen 1 bis 3 oder 11 bis 13, Enzymextrakten daraus oder mittels eines Polypeptids gemäss den Ansprüchen 4 oder 5, zu den Verbindungen der Formeln I, II, VII oder VIII, sowie gegebenenfalls Isolierung dieser Verbindungen.

16. Verfahren zur Herstellung von (R)-3,3,3-Trifluor-2-hydroxy-2-methylpropionsäure der Formel



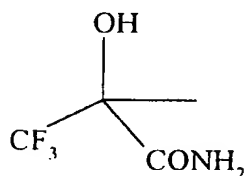
II

und / oder von (S)-3,3,3-Trifluor-2-hydroxy-2-methylpropionsäureamid der Formel



VII

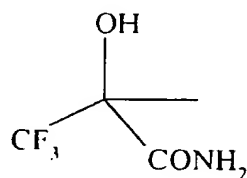
umfassend die Umsetzung des Propionsäureamids der Formel



VI

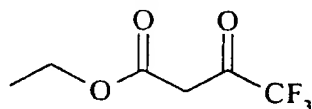
mittels eines Mikroorganismus gemäss Anspruch 2 der Gattung Klebsiella, mittels eines Mikroorganismus gemäss den Ansprüchen 11 bis 14 oder einem Polypeptid gemäss den Ansprüchen 4 und 5 zu der Verbindung der Formel II, sowie gegebenenfalls Isolierung dieser Verbindung und / oder der bei dieser Umsetzung anfallenden Verbindung der Formel VII.

17. Verfahren nach Anspruch 15 oder 16, dadurch gekennzeichnet, dass das Propionsäureamid der Formel



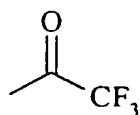
VI

dadurch hergestellt wird, dass in der ersten Stufe Trifluoracetessigester der Formel



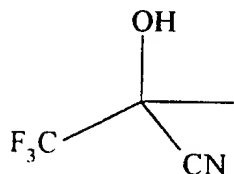
III

mit einer Mineralsäure in Trifluoraceton der Formel



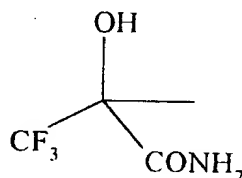
IV

überführt wird, dieses in der zweiten Stufe mit einem Cyanid in das Propionsäurenitril der Formel



V

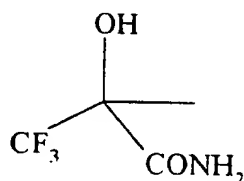
überführt wird und dieses in der dritten Stufe entweder chemisch mit einer konzentrierten Mineralsäure oder mikrobiologisch mit mutierten Mikroorganismen der Gattung *Rhodococcus* in das Propionsäureamid der Formel



VI

überführt wird.

18. Verfahren nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, dass man in der ersten und dritten Stufe als Mineralsäure Schwefelsäure, Phosphorsäure oder Salpetersäure verwendet.
19. Verfahren nach Anspruch 17 oder 18, dadurch gekennzeichnet, dass man in der zweiten Stufe als Cyanid ein Alkalimetallcyanid verwendet.
20. Verfahren nach einem der Ansprüche 15 bis 19, dadurch gekennzeichnet, dass man die Umsetzung des Propionsäureamids der Formel

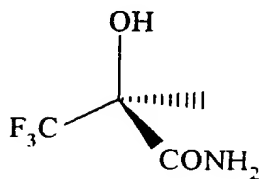


VI

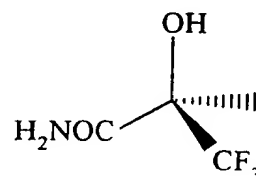
mittels Mikroorganismen der Gattung *Klebsiella*, *Rhodococcus*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Escherichia*, *Comamonas*, *Acinetobacter*, *Rhizobium*, *Agrobacterium*,

Rhizobium / Agrobacterium oder Pseudomonas durchführt.

21. Verfahren nach einem der Ansprüche 15 bis 20, dadurch gekennzeichnet, dass das (S)- oder (R)-3,3,3-Trifluor-2-hydroxy-2-methylpropionsäureamid der Formeln



VII



VIII

entweder chemisch in Gegenwart einer Base oder mikrobiologisch mittels Mikroorganismen der Gattung Rhodococcus zur Verbindung der Formel I oder II hydrolysiert wird.

22. (R)-3,3,3-Trifluor-2-hydroxy-2-methylpropionsäureamid.
23. (S)-3,3,3-trifluor-2-hydroxy-2-methylpropionsäureamid.

Fig. 1

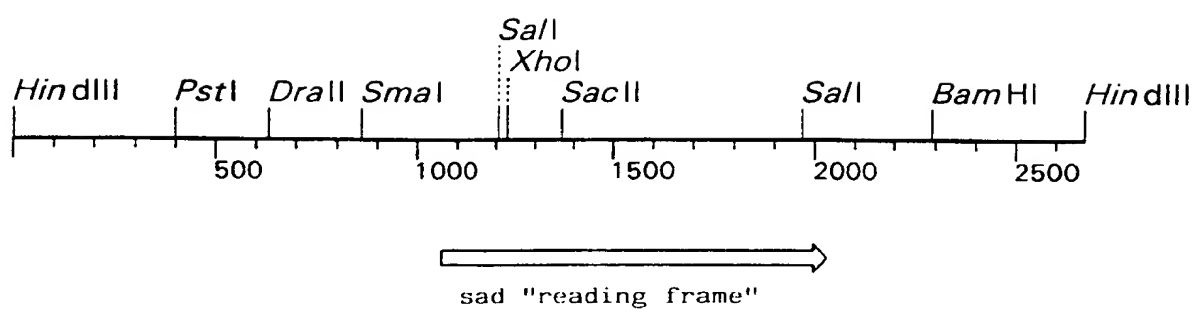


Fig. 2

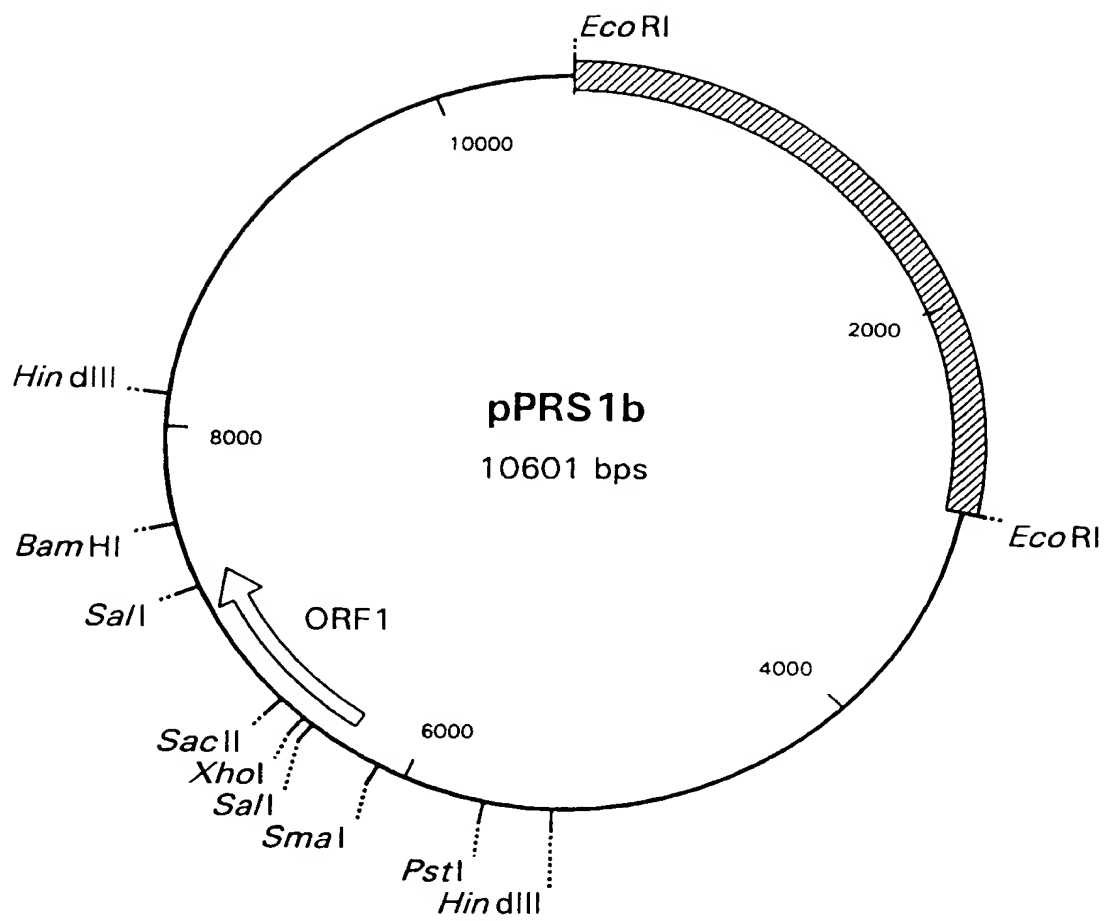


Fig. 3

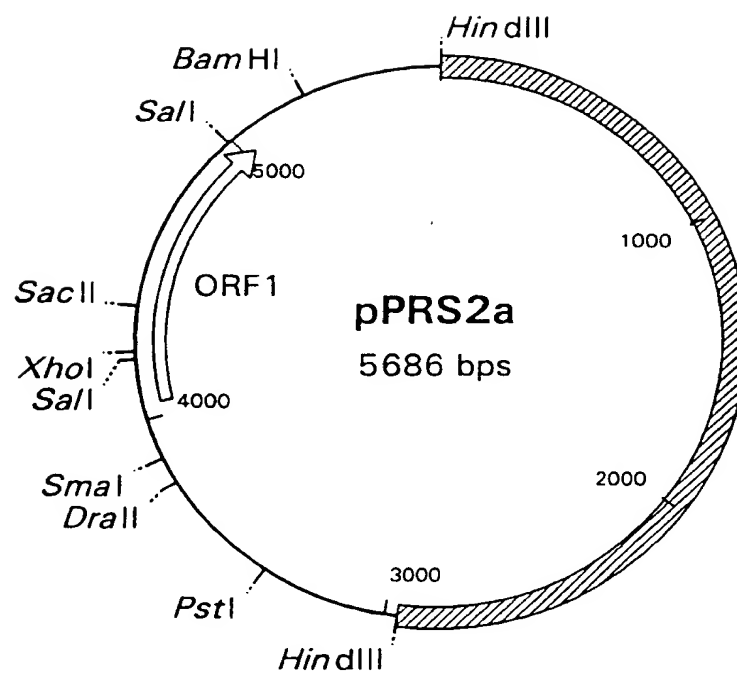


Fig. 4

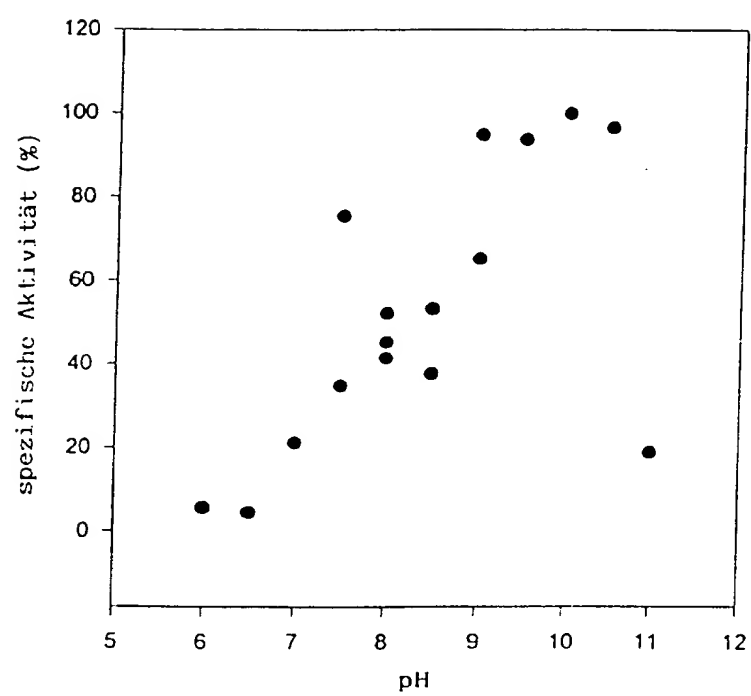


Fig. 5

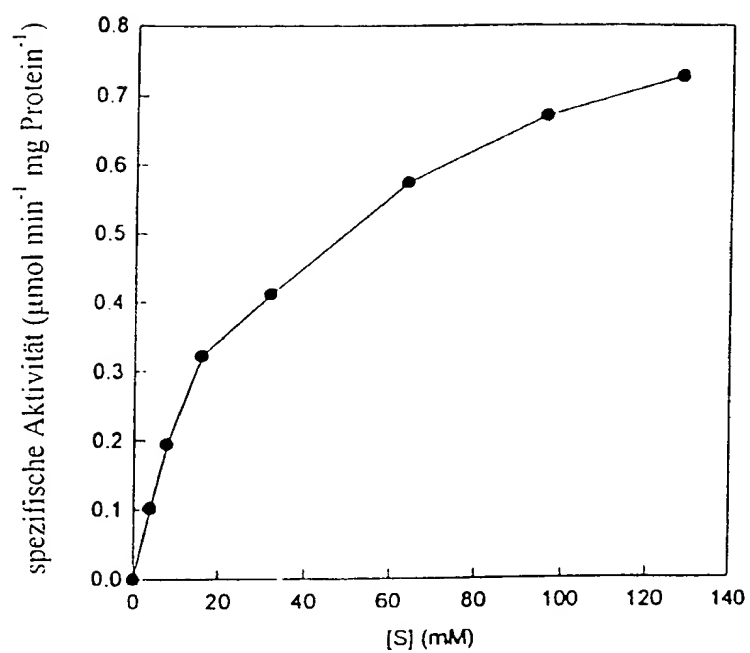
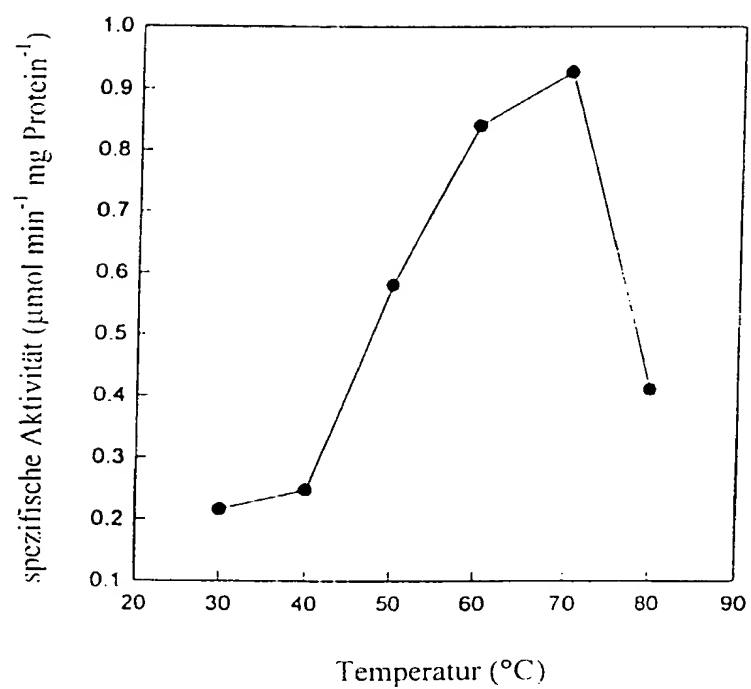


Fig. 6



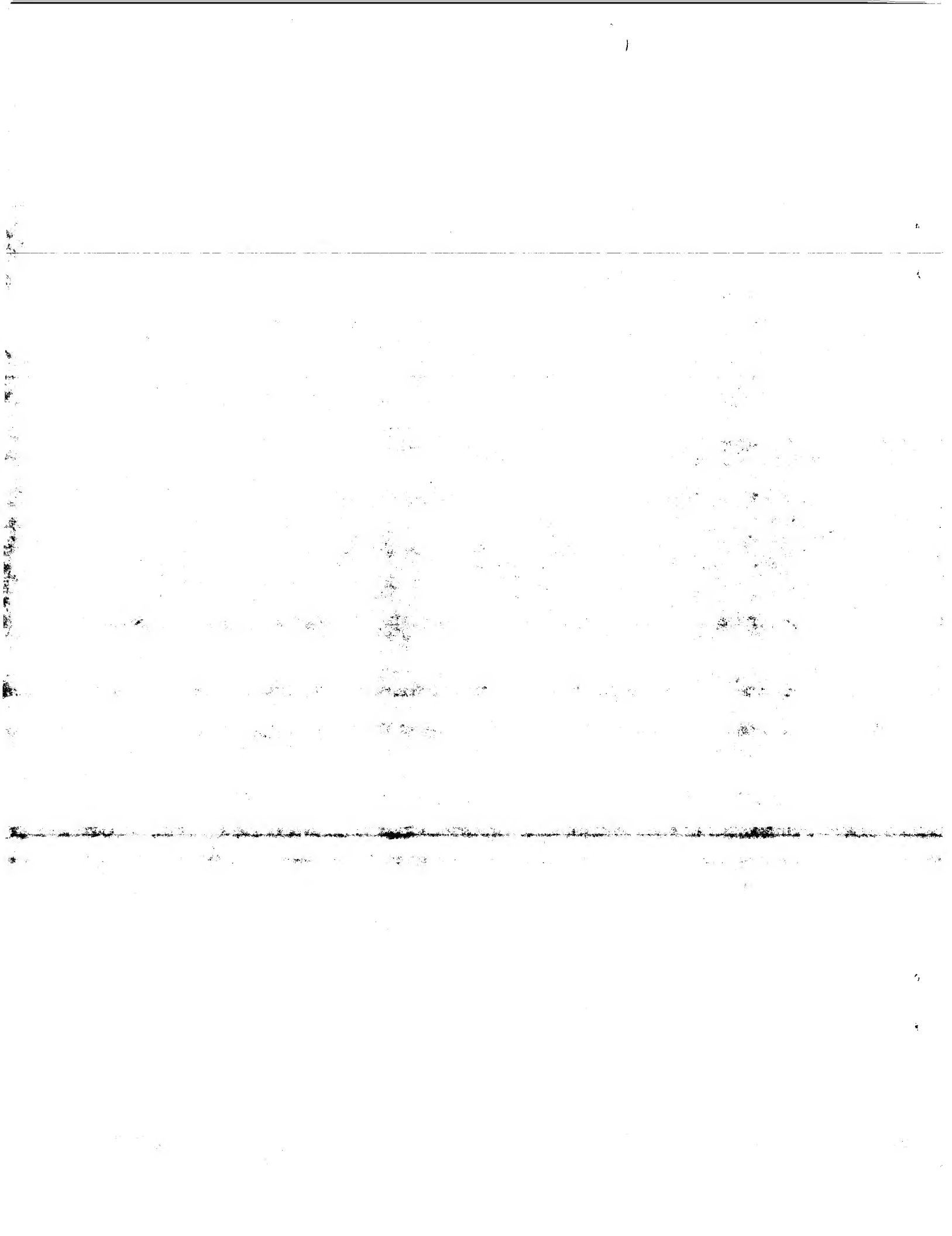
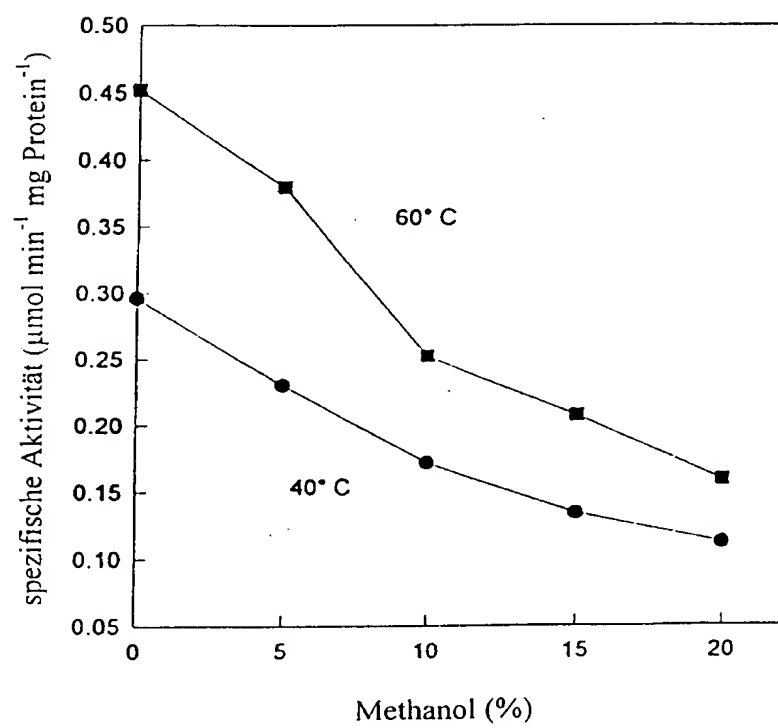


Fig. 7



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 97/03670

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C12N15/55 C12N9/80 C12P41/00 C12P7/42 C12N1/21
 C12N1/20 C07C235/06 C07C231/06 //C12P13/02, (C12N1/20,
 C12R1:06, C12R1:07, C12R1:22, C12R1:38, C12R1:41), (C12N1/21, C12R1:01)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12P C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP 0 433 117 A (RHONE POULENC SANTE) 19 June 1991 see page 2, line 1 - page 4, line 3 ---	4-14
A	EP 0 356 912 A (IDEMITSU KOSAN COMPANY LIMITED) 7 March 1990 see page 2, line 15 - page 3, line 4 see page 3, line 14 - line 43 ---	1-3, 15, 16
A	EP 0 524 781 A (IMPERIAL CHEMICAL INDUSTRIES) 27 January 1993 cited in the application see page 43, line 24 - line 50 -----	15, 16, 22, 23



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

12 December 1997

Date of mailing of the international search report

19/12/1997

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
 Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Montero Lopez, B

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Intern. Application No

PCT/EP 97/03670

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 433117 A	19-06-91	FR 2655660 A	14-06-91
		AT 152481 T	15-05-97
		AU 631696 B	03-12-92
		AU 6661490 A	13-06-91
		CA 2030073 A	12-06-91
		CN 1052508 A	26-06-91
		DE 69030615 D	05-06-97
		DE 69030615 T	06-11-97
		JP 4218379 A	07-08-92
		US 5260208 A	09-11-93
EP 356912 A	07-03-90	US 5238828 A	24-08-93
		JP 2257893 A	18-10-90
EP 524781 A	27-01-93	AT 136027 T	15-04-96
		AU 648423 B	21-04-94
		AU 2047692 A	28-01-93
		CA 2074605 A	26-01-93
		CN 1069727 A	10-03-93
		DE 69209395 D	02-05-96
		DE 69209395 T	17-10-96
		ES 2084944 T	16-05-96
		HU 213605 B	28-08-97
		HU 9500228 A	28-08-95
		IE 72507 B	23-04-97
		IL 102626 A	05-12-96
		JP 5286915 A	02-11-93
		MX 9204355 A	01-04-93
		NO 178300 B	20-11-95
		NZ 243686 A	27-04-95
		PL 171933 B	31-07-97
		PL 171991 B	31-07-97
		SK 234292 A	08-03-95
		RU 2074173 C	27-02-97
		US 5382598 A	17-01-95
		US 5474999 A	12-12-95
		US 5565477 A	15-10-96
		US 5567735 A	22-10-96
		US 5565465 A	15-10-96
		US 5684198 A	04-11-97

Information on patent family members

PCT/EP 97/03670

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1992)

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Intern Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 97/03670

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES IPK 6 C12N15/55 C12N9/80 C12P41/00 C12P7/42 C12N1/21 C12N1/20 C07C235/06 C07C231/06 //C12P13/02, (C12N1/20, C12R1:06, C12R1:07, C12R1:22, C12R1:38, C12R1:41), (C12N1/21, C12R1:01)		
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK		
B. RECHERCHIERTE GEBIETE Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole) IPK 6 C12P C12N		
Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen		
Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)		
C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	EP 0 433 117 A (RHONE POULENC SANTE) 19. Juni 1991 siehe Seite 2, Zeile 1 - Seite 4, Zeile 3 ---	4-14
A	EP 0 356 912 A (IDEMITSU KOSAN COMPANY LIMITED) 7. März 1990 siehe Seite 2, Zeile 15 - Seite 3, Zeile 4 siehe Seite 3, Zeile 14 - Zeile 43 ---	1-3, 15, 16
A	EP 0 524 781 A (IMPERIAL CHEMICAL INDUSTRIES) 27. Januar 1993 in der Anmeldung erwähnt siehe Seite 43, Zeile 24 - Zeile 50 -----	15, 16, 22, 23
<input type="checkbox"/> Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen <input checked="" type="checkbox"/> Siehe Anhang Patentfamilie		
* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen : "A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist "E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist "L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt) "O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht "P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist "T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist "X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden "Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist "Z" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist		
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche 12. Dezember 1997		Absendedatum des internationalen Recherchenberichts 19/12/1997
Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl. Fax: (+31-70) 340-3016		Bevollmächtigter Bediensteter Montero Lopez, B

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internes Aktenzeichen

PCT/EP 97/03670

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP 433117 A	19-06-91	FR 2655660 A	14-06-91
		AT 152481 T	15-05-97
		AU 631696 B	03-12-92
		AU 6661490 A	13-06-91
		CA 2030073 A	12-06-91
		CN 1052508 A	26-06-91
		DE 69030615 D	05-06-97
		DE 69030615 T	06-11-97
		JP 4218379 A	07-08-92
		US 5260208 A	09-11-93
EP 356912 A	07-03-90	US 5238828 A	24-08-93
		JP 2257893 A	18-10-90
EP 524781 A	27-01-93	AT 136027 T	15-04-96
		AU 648423 B	21-04-94
		AU 2047692 A	28-01-93
		CA 2074605 A	26-01-93
		CN 1069727 A	10-03-93
		DE 69209395 D	02-05-96
		DE 69209395 T	17-10-96
		ES 2084944 T	16-05-96
		HU 213605 B	28-08-97
		HU 9500228 A	28-08-95
		IE 72507 B	23-04-97
		IL 102626 A	05-12-96
		JP 5286915 A	02-11-93
		MX 9204355 A	01-04-93
		NO 178300 B	20-11-95
		NZ 243686 A	27-04-95
		PL 171933 B	31-07-97
		PL 171991 B	31-07-97
		SK 234292 A	08-03-95
		RU 2074173 C	27-02-97
		US 5382598 A	17-01-95
		US 5474999 A	12-12-95
		US 5565477 A	15-10-96
		US 5567735 A	22-10-96
		US 5565465 A	15-10-96
		US 5684198 A	04-11-97

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 97/03670

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP 524781 A		US 5272163 A	21-12-93

